

# **Vergleichende Analyse pathogener Oralstreptokokkenisolate mit Hilfe eines virulenzfaktorbasierten DNS-Microarrays**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von    Andreas Itzek  
aus    Halberstadt

1. Referentin oder Referent: apl. Professor Dr. Gursharan Singh Chhatwal  
2. Referentin oder Referent: Professor Dr. Dieter Jahn  
eingereicht am: 08.05.2009  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.10.2009  
Druckjahr: 2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>2</b>
2.1 Der Lebensraum Mundhöhle.....	2
2.2 Die Gruppe der Oralstreptokokken.....	3
2.2.1 Oralstreptokokken als Kommensale .....	6
2.2.2 Oralstreptokokken als Pathogene .....	7
2.3 Ziele dieser Arbeit .....	10
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
3.1 Verwendete Materialien .....	11
3.2 Verwendete Bakterienstämme.....	11
3.2.1 Klinische Oralstreptokokkenisolate .....	11
3.2.2 Weitere Streptokokkenstämme.....	12
3.3 Mikrobiologische Methoden.....	12
3.3.1 Langzeitstammhaltung .....	12
3.3.2 Kultivierung der Bakterien.....	13
3.3.3 Zellaufschluss.....	13
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	14
3.4.1 Allgemeine Techniken .....	14
3.4.1.1 Präparation genomischer DNS .....	14
3.4.1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	14
3.4.1.3 Agarosegelelektrophorese .....	14
3.4.1.4 Polymerasekettenreaktion .....	15
3.4.1.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	16
3.4.2 Methoden für Microarrayanalysen .....	16
3.4.2.1 Drucken und Blocken der Microarrayslides .....	17
3.4.2.2 Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNS .....	17
3.4.2.3 Konzentrationsbestimmung fragmentierter DNS.....	19
3.4.2.4 Biotinylierung fragmentierter DNS.....	19
3.4.2.5 Erstellung des Hybridisierungsgemisches.....	19
3.4.2.6 Hybridisierung .....	20
3.4.2.7 Färbung und Signaldetektion.....	20
3.5 EDV Methoden .....	21
3.5.1 Selektion der Streptokokkengene für den Microarray .....	21
3.5.1.1 Auswahl von Genen extrazellulärer Proteine.....	21
3.5.1.2 Auswahl zusätzlicher Gene .....	21
3.5.2 Sequenzanalysen.....	22

3.5.3 Signalverarbeitung .....	22
3.5.3.1 Auslesen der Fluoreszenzintensitäten .....	22
3.5.3.2 Normalisierung und Clusteranalysen.....	22
3.5.3.3 Schwellenwertberechnung und Einzelauswertung .....	23
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
4.1 Entwicklung des Microarrays.....	24
4.1.1 Auswahl der Streptokokkengene .....	24
4.1.2 Entwicklung interner Kontrollen .....	25
4.1.2.1 Genomkontrollen .....	26
4.1.2.2 Markierungskontrollen .....	26
4.1.2.3 Hybridisierungskontrollen.....	27
4.1.2.4 Spezifitätskontrollen.....	28
4.1.3 Sondenanordnung innerhalb des Microarrays.....	29
4.1.4 Testhybridisierungen .....	30
4.1.4.1 Einstellung der Hybridisierungsmenge der genomischen DNS.....	31
4.1.4.2 Überprüfung der Genomkontrollen.....	32
4.1.4.3 Einstellung der Spiked-In Kontrollen .....	33
4.1.5 Berechnungen zur Signalintensität .....	35
4.1.5.1 Signalnormalisierung .....	37
4.1.5.2 Schwellenwertberechnung .....	43
4.2 Microarrayanalysen klinischer Isolate.....	46
4.2.1 Auswahl und Analyse klinischer Oralstreptokokkenisolate .....	46
4.2.2 Clusteranalysen der Microarraysignale .....	48
4.2.2.1 Speziestypisierung mit Hilfe hierarchischer Clusteranalysen .....	48
4.2.2.2 Phylogenetische Analysen.....	51
4.2.3 Vorkommen und Verbreitung virulenzrelevanter Gene .....	54
4.2.3.1 Überblick über Ursprung und Verbreitung virulenzrelevanter Gene ...	54
4.2.3.2 Betrachtung einzelner Virulenzfaktorgruppen .....	58
4.2.4 Identifizierung diagnostischer Sonden.....	66
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>67</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>74</b>
6.1 Projektübersicht .....	74
6.2 Programme und Datenbanken .....	75
6.3 Literaturverzeichnis .....	75
6.3.1 Fachbücher.....	75
6.3.2 Methodenliteratur.....	76
6.3.3 Artikel aus Fachzeitschriften.....	76
6.4 Stammsammlungsliste.....	84
6.5 Genliste.....	86
<b>7 Danksagung.....</b>	<b>100</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.2 Phylogenetische Beziehungen zwischen 34 Arten der Gattung <i>Streptococcus</i> .....	4
3.4.1.4 Nukleinsäuresequenzen der 16S-rRNA-Gen-spezifischen Oligonukleotide....	15
3.4.2.2 Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNS .....	18
4.1.1 Genauswahl für den Microarray .....	25
4.1.2.1 Nukleinsäuresequenzen der Genomkontrollsonden .....	26
4.1.2.2.1 Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrollsonden .....	27
4.1.2.2.2 Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrolloligonukleotide .....	27
4.1.2.3.1 Nukleinsäuresequenzen der Hybridisierungskontrollsonden .....	28
4.1.2.3.2 Nukleinsäuresequenzen der Hybridisierungskontrolloligonukleotide .....	28
4.1.2.4 Nukleinsäuresequenzen der Spezifitätskontrollsonden .....	29
4.1.3.1 Schematische Darstellung eines Microarrayslides .....	29
4.1.3.2 Schematische Darstellung eines Pinarrays .....	30
4.1.4.1 Einfluss der Hybridisierungsmenge der genomischen DNS auf die Fluoreszenzintensität der Spezifitätskontrollen .....	31
4.1.4.2 Testhybridisierung zur Überprüfung der Genomkontrollen .....	32
4.1.4.3.1 Optimierung der Spiked-In Kontrollen .....	33
4.1.4.3.2 Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten der Spiked-In Kontrollen und des Fluoreszenzintensitätsbereichs der Gensonden .....	34
4.1.5 Vergleich der Fluoreszenzsignale von zwei Microarrays .....	36
4.1.5.1.1 Beschreibung der interexperimentellen Abweichungen .....	38
4.1.5.1.2 Normalisierung der Fluoreszenzsignale der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollsonden und Druckpufferkontrolle .....	39
4.1.5.1.3 Auswirkung der Normalisierung auf die Signale der Gensonden .....	41
4.1.5.1.4 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollsonden aus 49 Hybridisierungsexperimenten .....	42
4.1.5.1.5 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollsonden aus 49 Hybridisierungsexperimenten nach Normalisierung .....	43
4.1.5.2.1. Ermittlung des Schwellenwertes .....	44
4.1.5.2.2 Pinarraybasierte Schwellenwertberechnung .....	45
4.2.2.1. Clusteranalyse von 49 klinischen Bakterienisolaten .....	49
4.2.2.2. Gegenüberstellung der phylogenetischen Analysen .....	52

4.2.3.1.1 Gegenüberstellung der Isolatanzahl und der Anzahl positiver Signale pro analysierter Streptokokkenart .....	55
4.2.3.1.2 Überblick über Ursprung und Verteilung virulenzrelevanter Gene innerhalb der analysierten Streptokokkenarten .....	56
4.2.3.2.1 Verteilung der Signale für Gene von Adhäsinen.....	59
4.2.3.2.2 Verteilung der Signale für Gene antiphagozytischer Faktoren, Hämolysine und Exotoxine .....	60
4.2.3.2.3 Verteilung der Signale für Gene von Spreading-Faktoren.....	62
4.2.3.2.4 Verteilung der Signale für Gene hypothetischer Proteine .....	65
4.2.4 Verteilung der Signale spezies- oder gruppenspezifischer Sonden .....	66
6.1 Projektübersicht.....	75

## Tabellenverzeichnis

3.2.2 Verwendete Teststämme aus der Gattung <i>Streptococcus</i> .....	12
3.4.1.4.1 Zusammensetzung der Polymerasekettenreaktion.....	15
3.4.1.4.2 Programm der Polymerasekettenreaktion.....	16
3.4.2.2 Berechnung der durchschnittlichen Länge eines Streptokokkengens.....	17
3.4.2.4 Zusammensetzung der Biotinylierungsreaktion.....	19
3.4.2.5 Zusammensetzung des Hybridisierungsgemisches .....	20
4.2.1 Auswahl klinischer Oralstreptokokkenisolate für die Microarrayanalysen .....	47
4.2.2 Schwer typisierbare Isolate innerhalb der Auswahl .....	48
6.4 Sammlung klinischer Oralstreptokokkenisolate .....	84
6.5 Gensonden des entwickelten DNS-Microarrays.....	86

# Abkürzungsverzeichnis

Alu	<i>Arthrobacter luteus</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	Center For Biological Sequence Analysis (Technic)
Cy5	Cyanin 5
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
lat.	lateinisch
NEB	New England Biolabs
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S.	<i>Streptococcus</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
THB	Todd Hewitt Broth
THY	Todd Hewitt Yeast
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Lösung titriert mit HCl
U	Unit (1 U = Umsatz von 1 M Substrat / min)

# 1 Zusammenfassung

Der Begriff Oralstreptokokken beschreibt zwölf Arten der Gattung *Streptococcus*, die zur natürlichen Mundraumflora des Menschen gehören. Verletzungen der oralen Schleimhäute und Gewebe, wie sie durch zahnmedizinische Eingriffe aber auch durch die tägliche mechanische Reinigung der Zahnoberflächen entstehen, verschaffen den Oralstreptokokken Zugang zum Blutkreislauf und somit auch zu anderen Bereichen des menschlichen Körpers. Dort können sie ein beachtliches pathogenes Potential entfalten und schwere Infektionen verursachen. Die bakteriellen Faktoren, die es den verschiedenen Oralstreptokokkenarten ermöglichen, medizinische Implantate und Gewebestrukturen zu kolonisieren, aber auch im Blutstrom zu persistieren, sind weitgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines speziesübergreifenden DNS-Microarraysystems zur Analyse von Oralstreptokokken. Die Genausstattung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Prototyps ermöglichte nicht nur Aussagen über die Verteilung bekannter Pathogenitätsfaktoren aus Oralstreptokokken, sondern auch die Detektion homologer Virulenzmechanismen aus obligat pathogenen Streptokokkenarten. Darüber hinaus erlaubten speziell entwickelte Kontrollen und Normalisierungsmethoden Speziesbestimmungen und phylogenetische Untersuchungen durch Clusteranalysen.

Eine Sammlung von 45 klinischen Oralstreptokokkenisolaten wurde mit Hilfe des entwickelten Microarraysystems analysiert. Clusteranalysen der normalisierten Signale bewiesen die Anwendbarkeit des Microarrays als Methode zur bakteriellen Speziestypisierung und verschafften darüber hinaus einen tiefergehenden Einblick in die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken. Die Betrachtung der genetischen Ausstattung mit extrazellulären Faktoren bildete die Grundlage für den Vorschlag, die Mitisgruppe in zwei phylogenetisch distinkte Gruppen aufzuteilen. Die Umrechnung der Microarraysignale in Präsenz-Absenz-Aussagen resultierte in einem Überblick über die Verteilung virulenzrelevanter Gene innerhalb der verschiedenen Arten der Oralstreptokokken. Dies ermöglichte den Nachweis mehrerer Gene bedeutender Virulenzfaktoren, die ursächlich mit der Pathogenität der analysierten Oralstreptokokkenisolate zusammenhängen können und stellt zugleich wertvolles Grundlagenwissen für die Entwicklung von therapeutischen und präventiven Maßnahmen dar. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten gruppen- und speziesspezifischen Nukleinsäuresonden liefern zudem initiale Daten für die Entwicklung praxistauglicher hybridisierungsbasierter Diagnosemethoden.



## 2 Einleitung

Viele Bereiche des menschlichen Körpers, die dauerhaft der Umwelt ausgesetzt sind, werden von Mikroorganismen bevölkert. Dabei stellt die Mundhöhle mit durchschnittlich  $10^9$  Bakterien pro Milliliter Speichel neben dem Dickdarm die am dichtesten besiedelte Körperregion dar. In der Mundhöhle eines Erwachsenen lassen sich 500 bis 700 verschiedene bakterielle Spezies nachweisen, von denen einige Mitglieder der Gattung *Streptococcus* am häufigsten isoliert werden. Diese zur Gruppe der Oralstreptokokken zusammengefassten Spezies kolonisieren als Kommensale alle Bereiche der menschlichen Mundhöhle (2.2.1). Die ständige Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Wirtes und kontinuierliche hygienische Reinigungsmaßnahmen des Mundraums sind dafür verantwortlich, dass sich diese Bakterien nicht ungehindert vermehren und ausbreiten (2.1). Dennoch kommt es immer wieder vor, dass Oralstreptokokken auch aus Regionen des menschlichen Körpers isoliert werden, die nicht ihrem natürlichen Lebensraum entsprechen und wo sie als Pathogene agieren (2.2.2). Die vorliegende Arbeit liefert einen neuen experimentellen Ansatz zur speziesübergreifenden Untersuchung von Oralstreptokokkenisolaten und trägt so dazu bei, die Pathogenität von Oralstreptokokken besser zu verstehen (2.3).

### 2.1 Der Lebensraum Mundhöhle

Die menschliche Mundhöhle bietet sowohl durch die konstante Feuchtigkeit und Temperatur als auch durch die kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen günstige Lebensbedingungen für eine ganze Reihe von Mikroorganismen. Ein Abwehrmechanismus des Körpers gegen eine ungehinderte Ausbreitung dieser mikrobiellen Flora ist der Speichelfluss. Der Speichel dient nicht nur als Gleitmittel zur Unterstützung des Kau- und Schluckaktes und der Einleitung des Nahrungsverdaus, sondern auch dem Schutz der oralen Schleimhäute und der Zahnhartsubstanz. Diese Schutzwirkung umfasst die Eliminierung von Bakterien durch Agglutination, Abspülen und Verschlucken, die Kontrolle des mikrobiellen Wachstums durch antibakterielle Enzyme und die Ausbildung einer Schutzschicht auf den Mundraumoberflächen gegen die Auswirkungen bakterieller Säuren und Proteasen.

Die Agglutination von Bakterien erfolgt durch Speichelproteine wie Muzine, sekretorisches IgA, Speichelagglutinin, Lysozym und  $\beta_2$ -Mikroglobulin. In Kombination mit dem Speichelfluss erschwert die Agglutination die Anheftung der Bakterien an orale Oberflächen. Die Bakterienaggregate werden verschluckt und im Verdauungstrakt von der Magensäure abgetötet. Der Speichel enthält zudem eine ganze Reihe antibakteriell wirksamer Proteine. Lysozym, Histatine und  $\beta$ -Defensine wirken bakterizid. Für Lactoferrin und verschiedene Speichelperoxidasen wurde eine bakteriostatische Wirkung nachgewiesen (Sanderink *et al.*, 2004). Der

Speichelfluss dient auch dem Schutz der oralen Schleimhäute und der Zahnhartsubstanz gegenüber Säuren und Proteasen. Speichelmuzine bilden zusammen mit anderen Speichelbestandteilen einen Film (Pellicel) auf allen oralen Oberflächen. Dieser stellt sowohl ein effektives Puffersystem als auch eine Diffusionsbarriere zum Schutz der Zahnschmelz vor Säuren und Demineralisierung dar. Zudem weisen Speichelmuzine eine hohe Anzahl von Kohlenhydratseitenketten auf und bilden mit anderen Speichelproteinen heterotypische Komplexe, die von Proteasen nicht abgebaut werden können und somit die Schleimhäute vor proteolytischen Angriffen schützen.

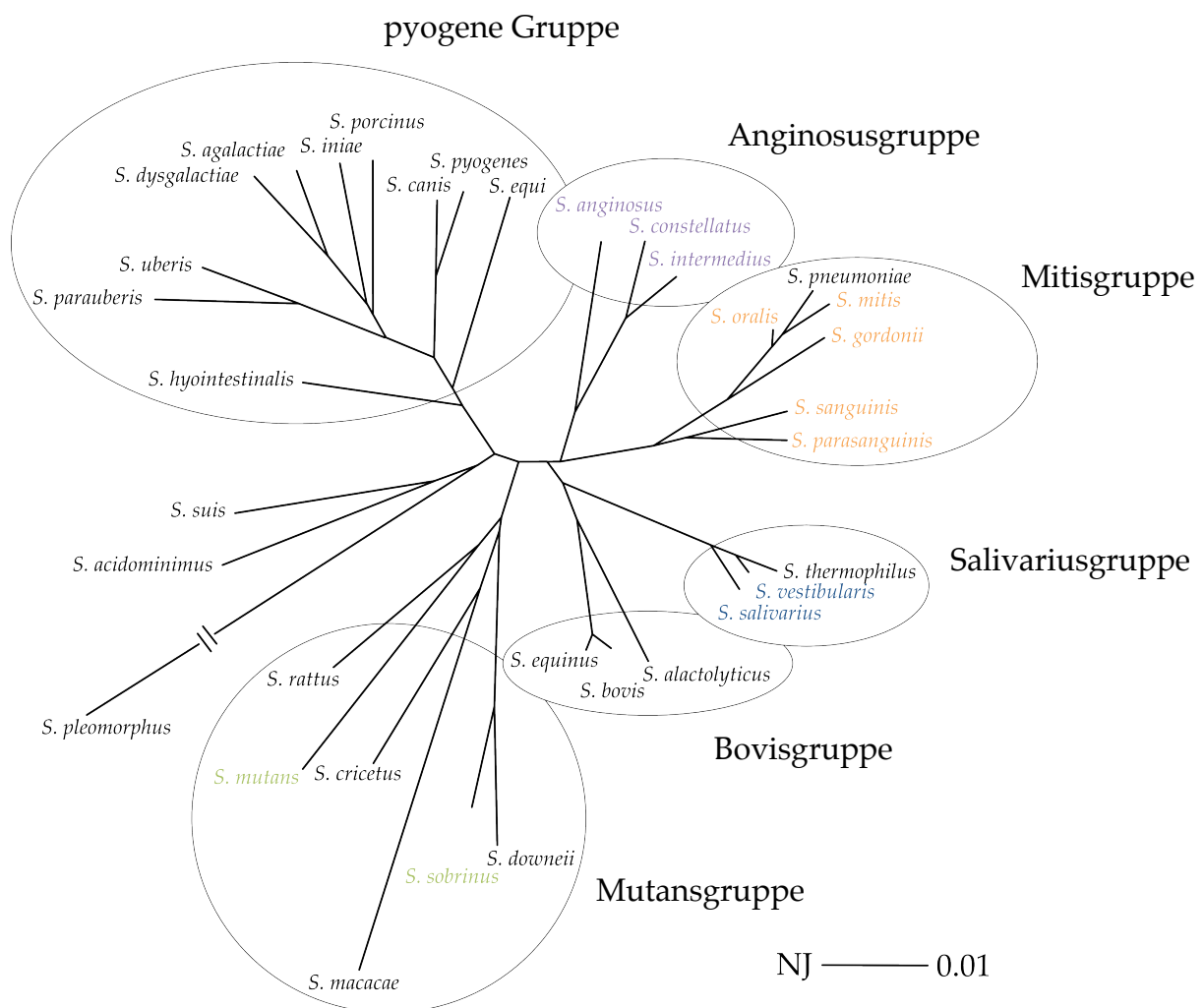
Abgesehen von diesen körpereigenen Abwehrmechanismen werden die Besiedler der menschlichen Mundhöhle kontinuierlich mit extremen Umweltbedingungen konfrontiert. Während der Mahlzeiten setzen drastische Temperaturschwankungen, konzentrierte Fruchtsäuren sowie die Abrasion der oralen Oberflächen durch den Kauakt der oralen Flora zu. Zusätzlich verhindert die kontinuierliche Reinigung der Mundhöhle durch mechanisches Putzen mit Präparaten, die Schleifmittel, Detergenzien und antibakterielle Wirkstoffe enthalten, eine dauerhafte Kolonisierung der oralen Oberflächen. Das Überleben der Bakterien im Mundraum unter solchen Umweltbedingungen ist abhängig von drei Faktoren. Um dem Verschlucken durch den Speichelfluss zu entgehen, müssen Mundraumbewohner die Agglutination durch Speichelproteine vermindern. Zweitens müssen sie effektiv an orale Oberflächen binden und diese kolonisieren. Drittens bieten mikrobielle Gemeinschaften in Form von Biofilmen (Plaques) Schutz vor extremen Umweltbedingungen und antibakteriellen Substanzen.

Zu den erfolgreichsten Besiedlern der menschlichen Mundhöhle gehören einige Arten der Gattung *Streptococcus*, die unter der Bezeichnung Oralstreptokokken zusammengefasst werden.

## 2.2 Die Gruppe der Oralstreptokokken

Die Gattung *Streptococcus* gehört der Ordnung *Lactobacillales* an und umfasst derzeit über 70 Arten. Streptokokken sind aerotolerant, unbeweglich, grampositiv, oxidase- und katalase-negativ und bilden keine Sporen. Die Kohlenhydratverwertung ist fermentativ, sie können jedoch auch Sauerstoff metabolisieren. Eine bis heute gebräuchliche Methode zur Klassifizierung von Streptokokken ist die Einteilung nach Hämolyseverhalten. Kommensale Arten zeigen auf Blutagarplatten meist eine unvollständige Hämolyse. Diese als  $\alpha$ -Hämolyse bezeichnete Form wird auf die Oxidation des Hämoglobins zu Biliverdin zurückgeführt. Die Erythrozytenmembran bleibt dabei weitgehend intakt und es können um die Bakterienkolonien herum grüne Höfe unterschiedlicher Farbintensität beobachtet werden. Dies prägte den Begriff Viridansstreptokokken (lat. *viridis*=grün). Den menschlichen Mundraum besiedelnde Viridansstreptokokkenarten werden unter dem Begriff Oralstrepto-

kokken zusammengefasst. Dazu zählen auch einige Streptokokkenarten, die in der Lage sind, andere Formen der Hämolyse zu verursachen. Die  $\beta$ -Hämolyse, die vorwiegend bei obligat pathogenen Streptokokken der pyogenen Gruppe zu beobachten ist und innerhalb der Oralstreptokokken nur von einigen Isolaten aus der Anginosusgruppe verursacht wird, kann auf die Funktion von Exotoxinen zurückgeführt werden, die die Erythrozytenmembran vollständig zerstören. Das Fehlen von hämolytischen Höfen um die bakteriellen Kolonien herum wird als  $\gamma$ -Hämolyse bezeichnet und tritt bei Oralstreptokokken ebenfalls auf. Die Gruppe der Oralstreptokokken umfasst 12 Arten aus 4 Gruppen der Gattung *Streptococcus*. Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gattung basierend auf 16S-rRNA-Gensequenzanalysen (Kawamura *et al.*, 1995).



**Abbildung 2.2: Phylogenetische Beziehungen zwischen 34 Arten der Gattung *Streptococcus*.** Dargestellt sind die phylogenetischen Beziehungen von 34 Arten der Gattung *Streptococcus* ermittelt anhand vergleichender 16S-rRNA-Gensequenzanalysen nach der neighbor-joining Methode. Die Darstellung nach Kawamura *et al.*, 1995, wurde durch farbliche Kennzeichnung der Oralstreptokokken modifiziert. Die Farbdarstellung fasst die Oralstreptokokkenarten nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* zusammen. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau) und Mutansgruppe (grün).

Die Mutansgruppe verdankt ihren Namen dem bekanntesten Vertreter der Oralstreptokokken, dem Erreger der Zahnkaries *Streptococcus mutans*. Von den Mitgliedern dieser Gruppe können nur die Arten *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* regelmäßig aus Zahnplaque isoliert werden. *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus* und *Streptococcus downei* sind nur selten in der menschlichen Mundhöhle zu finden, während *Streptococcus macacae* bisher ausschließlich in Affen nachzuweisen war (Herzberg *et al.*, Molecular Biology of Streptococci, 2007). *Streptococcus mutans* gilt als Haupterreger der Zahnkaries (Beighton, 2005) und ist somit die einzige Oralstreptokokkenart, die in ihrem natürlichen Lebensraum, der Mundhöhle, ein Pathogen für den Menschen darstellt. Zurückzuführen ist diese Pathogenität auf eine besonders ausgeprägte Azidogenität und Aziduri. *Streptococcus mutans* setzt Saccharose deutlich schneller zu Milchsäure um als andere Oralstreptokokkenarten (de Soet *et al.*, 2000). Die daraus resultierende Ansäuerung des Milieus inhibiert das Wachstum anderer Bakterien, wird aber von *Streptococcus mutans* toleriert (Bender *et al.*, 1985). Der dadurch entstehende Vorteil ermöglicht es dieser Spezies, sich effizient gegen andere Besiedler der Zahnoberfläche durchzusetzen. Gleichzeitig wird die Zahnhartsubstanz durch Demineralisierung nachhaltig geschädigt und Karies entsteht. *Streptococcus sobrinus* ist gegen das im Speichel enthaltene N-Acetylglucosamin empfindlich. Für Überleben und Wachstum dieser Streptokokkenart ist ein kariogenes Milieu mit niedrigem pH-Wert nötig, weshalb *Streptococcus sobrinus* nur in enger Gemeinschaft mit *Streptococcus mutans* zu finden ist.

Die zwei Oralstreptokokkenarten der Salivariusgruppe *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus vestibularis* sind weitestgehend unauffällige Kommensalen der Mundhöhle und können hauptsächlich von Schleimhautoberflächen des Mundvorhofs und der Zunge isoliert werden. Abgesehen von *Streptococcus thermophilus*, der zur Salivariusgruppe, aber nicht zu den Oralstreptokokken gehört, weil er sich nicht dauerhaft in der menschlichen Mundhöhle etablieren kann, ist wenig über die Arten dieser Gruppe bekannt. *Streptococcus thermophilus* ist umfassend untersucht, da dieser in der Produktion fermentierter Milchprodukte eingesetzt wird und daher von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. Ein *Streptococcus salivarius* Isolat wird als Probiotikum gegen Pharyngitis angewendet, die durch *Streptococcus pyogenes* hervorgerufen wird (Tagg, 2004).

Im Gegensatz zu den Oralstreptokokkenarten der Mutansgruppe, die spezifisch die Zahnhartsubstanz kolonisieren oder der Salivariusgruppe, die hauptsächlich auf den Schleimhäuten zu finden sind, lassen sich die Oralstreptokokken der Mitisgruppe aus nahezu jedem Bereich der menschlichen Mundhöhle isolieren. Durchschnittlich 60% der Bakterien in frischem Zahnplaque sind der Mitisgruppe zuzuordnen (Nyvad *et al.*, 1990). Deshalb gelten sie als Pionierbesiedler der Zahnhartsubstanz und Auslöser der Plaquebildung. Die Zugehörigkeit von *Streptococcus pneumoniae* zur Gruppe der Oralstreptokokken ist streitbar. Phylogenetisch ist *Streptococcus pneumoniae* sehr eng mit den Mitgliedern der Mitisgruppe *Streptococcus mitis* und

*Streptococcus oralis* verwandt, was durch 16S-rRNA-Gensequenzvergleiche (Kawamura *et al.*, 1995) und DNS-Hybridisierungsexperimente (Hakenbeck *et al.*, 2001) belegt wurde. Die Gruppe der Oralstreptokokken umfasst per Definition jedoch nur Streptokokkenarten, deren natürlicher Lebensraum die menschliche Mundhöhle ist und die daher regelmäßig aus dieser isoliert werden können. *Streptococcus pneumoniae* kolonisiert bevorzugt die Schleimhäute des Nasopharynx und kann in der Mundhöhle nur als transienter Keim nachgewiesen werden. Daher wurde diese Spezies in der vorliegenden Arbeit nicht zur Gruppe der Oralstreptokokken gezählt.

Die Anginosusgruppe umfasst die drei Arten *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* und *Streptococcus intermedius*, die alle zur Gruppe der Oralstreptokokken gezählt werden. Die drei Arten sind regelmäßig, aber nur in geringen Keimzahlen aus Zahnplaque und von oralen Schleimhautoberflächen isolierbar. Darüber hinaus besiedelt *Streptococcus anginosus* den menschlichen Urogenital- und Gastrointestinaltrakt, während *Streptococcus constellatus* auch im Respirationstrakt zu finden ist. Für alle drei Arten der Anginosusgruppe existieren Isolate, die auf Blutagarplatten eine für Oralstreptokokken ansonsten untypische  $\beta$ -Hämolyse zeigen.

### 2.2.1 Oralstreptokokken als Kommensale

Die Persistenz der Oralstreptokokken in der menschlichen Mundhöhle wird durch eine ganze Reihe bakterieller Faktoren ermöglicht. Pionierbesiedler der Mitisgruppe produzieren eine Protease, die spezifisch sekretorisches IgA1 inaktiviert (IgA1 protease) (Cole *et al.*, 1994). Dadurch wird die Agglutination der Bakterien unterbunden und die Kolonisierung oraler Oberflächen erleichtert (Tyler *et al.*, 1998). Da die rasche Adhäsion an Mundraumoberflächen für Oralstreptokokken überlebenswichtig ist, besitzen sie eine ganze Reihe verschiedener Adhäsionsmechanismen. Am weitesten verbreitet sind Adhäsine der Antigen I/II Proteinfamilie (Ma *et al.*, 1991). Diese wurden bei *Streptococcus mutans* (SpaP, PAc, B, P1, SR, IF), *Streptococcus sobrinus* (SpaA, PAg), *Streptococcus gordonii* (SspA, SspB), *Streptococcus oralis* (SpaA), *Streptococcus sanguinis* (SSP-5, p130) und *Streptococcus intermedius* (PAs) nachgewiesen. Sie vermitteln nicht nur die Bindung an verschiedene Pellikelbestandteile und ermöglichen die spezifische Adhäsion an Zahnoberflächen, sondern leiten auch die Plaquebildung ein, indem sie die Interaktion der Streptokokken mit anderen Mundraumbakterien ermöglichen (Jakubovics *et al.*, 2005). *Streptococcus mutans* verwendet saccharoseabhängige Mechanismen zur Adhäsion an die Zahnoberfläche (Rölla *et al.*, 1983). Dazu produziert das Bakterium verschiedene Arten von Glukosyltransferasen, die sowohl auf der Zahnoberfläche (GtfC und GtfD) als auch auf der Bakterienoberfläche (GtfB) Glukane aus Saccharose bilden und damit eine Adhäsion ermöglichen (Vacca-Smith *et al.*, 1998). Glukanbindungsproteine (GbpA bis GbpD) fixieren die gebildeten Glukane auf der Bakterienoberfläche und unterstützen den Adhäsionsprozess (Matsumura *et al.*, 2003). Zudem dienen die extrazellulären Glukane als Schutzkapsel

und Energiespeicher. Oralstreptokokkenarten der Mitisgruppe besitzen Oberflächenproteine zur Bindung von Amylase (AbpA und AbpB) (Brown *et al.*, 1999). Amylase tritt nicht nur gelöst im Speichel auf, sondern ist auch Bestandteil des Pellikels. Somit wird über dieses Enzym die Adhäsion an orale Oberflächen ermöglicht. Bei *Streptococcus gordonii* wurde zudem ein Oberflächenprotein nachgewiesen (Hsa), das direkt an ein Speichelmucin des Pellikels bindet (Takahasi *et al.*, 2002). Die Pionierbesiedler der Mitisgruppe besitzen darüber hinaus spezifische Adhäsine, die Interaktionen mit anderen Mundraumbakterien ermöglichen, denen Pellikeladhäsionsmechanismen fehlen. Vor allem bei membrangebundenen Lipoproteinen der SsaB Familie, die in *Streptococcus gordonii* (SarA und ScaA), *Streptococcus sanguinis* (SsaB) und *Streptococcus parasanguinis* (FimA) vorkommen, konnte diese Funktion nachgewiesen werden (Ganeshkumar *et al.*, 1991). Auch die Oberflächenproteine CshA und CshB aus *Streptococcus gordonii* ermöglichen Interaktionen mit anderen Mundraumbakterien und fördern die Plaquebildung (McNab *et al.*, 1996).

Die Tatsache, dass viele der aufgeführten Oberflächenproteine nicht nur die Adhäsion und Kolonisierung oraler Oberflächen vermitteln, sondern auch die Bindung anderer Mundraumbakterien ermöglichen, bestätigt die Funktion der Oralstreptokokken als Pionierbesiedler und Initiatoren der Plaquebildung. Mundraumbakterien, die sich zu sessilen Gemeinschaften wie dem oralen Plaquebiofilm zusammenschließen, sind dauerhaft vor den Abwehrmechanismen des Speichelflusses sowie extremen Umweltbedingungen geschützt (Jefferson, 2004). Zudem ermöglicht eine räumlich eng zusammengeschlossene Gemeinschaft den intra- und interspezies Austausch von genetischem Material (Petersen *et al.*, 2005), was die Anpassung der Mundraumbakterien an ihren Lebensraum und somit ihre Überlebenschancen verbessert. Diese beispielhafte Adhäsions-, Anpassungs- und Überlebensfähigkeit ermöglicht es den Oralstreptokokken, auch andere Bereiche des menschlichen Körpers erfolgreich zu kolonisieren, wenn sie Zugang zu diesen bekommen. Dort können die oralen Kommensalen als Pathogene wirken.

### 2.2.2 Oralstreptokokken als Pathogene

Oralstreptokokken sind nicht in der Lage, den Pellikel und die oralen Schleimhäute aktiv zu durchdringen. Verletzungen der Schleimhautoberflächen führen jedoch dazu, dass die Bakterien in das darunterliegende Gewebe und den Blutstrom gelangen, was häufig zu Oralstreptokokkenbakteriämien führt. Diese treten nicht nur bei schwerwiegenden Eingriffen wie Zahnextraktionen (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2008) oder Tonsillektomien (Soldado *et al.*, 1998) auf, sondern auch beim täglichen mechanischen Reinigen der Zahnoberflächen (Lucas *et al.*, 2008). Das Immunsystem bekämpft solche Bakteriämien in den meisten Fällen so effektiv, dass sich im Normalfall keine Infektionsherde manifestieren können (Tomás *et al.*, 2007). Dennoch werden immer wieder Fälle bekannt, in denen Oralstreptokokken schwerwiegende Erkrankungen wie Sepsis (Chen *et al.*, 2006), streptokokkeninduziertes Toxisches Schocksyndrom (Lu *et al.*, 2003), Endokarditis (Lick *et al.*, 2005) oder Gewebsabszesse

(Ulivieri *et al.*, 2007) hervorrufen. Trotz intensiver Forschungsarbeit konnten die Mechanismen, die zu diesen Krankheitsbildern führen, bisher nur teilweise aufgeklärt werden. Der Ausbruch von streptokokkeninduziertem Toxischem Schocksyndrom in der Jiangsuprovinz in China wurde hervorgerufen durch ein *Streptococcus mitis* Isolat und konnte auf ein bisher unbekanntes Exotoxin zurückgeführt werden (Lu *et al.*, 2003). Wie das Gen des Toxins in dieses Oralstreptokokkenisolat gelangt ist, bleibt ungeklärt. Der genetische Austausch zwischen Bakterien in der menschlichen Mundhöhle stellt jedoch eine mögliche Ursache dar.

Oralstreptokokken gehören auch zu den Haupterregern der infektiösen Endokarditis (Iga *et al.*, 1991). Die Arten der Mitisgruppe *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus gordonii* werden dabei am häufigsten isoliert (Douglas *et al.*, 1993; Westling *et al.*, 2008). Erreicht eine Oralstreptokokkenbakteriämie über den Blutstrom das Herz, so besteht besonders bei vorgeschädigtem Herzklappengewebe die Gefahr, dass die Bakterien dort adhären und das Gewebe kolonisieren (Barrau *et al.*, 2004). Es werden zwei Mechanismen zur Adhäsion an geschädigtes Herzklappengewebe diskutiert. Ist das Gewebe derart geschädigt, dass Bestandteile der extrazellulären Matrix zugänglich werden, können die Bakterien direkt an diese Schadstelle binden. Für *Streptococcus gordonii* sind Oberflächenproteine beschrieben, die Bindung an Laminin und Fibronektin (FbpA) vermitteln (Sommer *et al.*, 1992; Christie *et al.*, 2002). Zudem besitzen einige Adhäsine, die im natürlichen Lebensraum von *Streptococcus gordonii* für Interaktionen mit anderen Mundraum Bakterien verantwortlich sind, im Blutstrom weitere Funktionen. Für CshA ist die Bindung an immobilisiertes Fibronektin beschrieben (McNab *et al.*, 1996), während die Adhäsine der Antigen I/II Familie SspA und SspB die Bindung an Kollagen vermitteln (Love *et al.*, 1997). Ähnliche Adhäsionsmechanismen, die die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix nutzen, wurden auch für andere Oralstreptokokkenarten beschrieben (Petersen *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004). Ist das geschädigte Gewebe bereits durch Bildung eines Thrombus geschützt, so sind einige Oralstreptokokken dennoch in der Lage, zu adhären. Für *Streptococcus parasanguinis* ist ein Oberflächenprotein beschrieben (FimA), das die Bindung an den Hauptbestandteil des Thrombus, das Fibrin, vermittelt (Burnette-Curley *et al.*, 1995). Auch *Streptococcus gordonii* kann direkt an einen Thrombus binden (Bensing *et al.*, 2004). Das Adhäsin Hsa, das im Mundraum die Bindung an ein Speichelmuzin vermittelt und somit die Kolonisierung oraler Oberflächen einleitet, besitzt im Blutstrom die Funktion eines Thrombozytenadhäsins (Takahashi *et al.*, 2004). Demgegenüber ist *Streptococcus sanguinis* nicht nur in der Lage, an einen Thrombus zu adhären (SsaB) (Herzberg *et al.*, 1996), sondern kann auch die Bildung eines Thrombus induzieren. Es wurde ein Oberflächenprotein beschrieben (PAAP), mit dessen Hilfe *Streptococcus sanguinis* nicht nur spezifisch an Thrombozyten bindet, sondern diese auch aktivieren kann (Erickson *et al.*, 1987, 1990, 1993). Die Bedeutung dieses Mechanismus für die Entwicklung einer infektiösen Endokarditis konnte im Tiermodell bestätigt werden (Herzberg *et al.*, 1992).

Diese Adhäsionsmechanismen, die nicht nur von Oberflächenproteinen vermittelt werden, die im natürlichen Lebensraum der Oralstreptokokken die Kolonisierung der oralen Oberflächen einleiten, sondern auch von spezifischen Bindungsproteinen, die erst nach dem Eintritt in den Blutstromes exprimiert werden (Erickson *et al.*, 1995) (Sommer *et al.*, 1992), können die Pathogenese der infektiösen Endokarditis nur zum Teil erklären. Die Fähigkeit zur Bindung von Thrombozyten ist nur für *Streptococcus sanguinis* und *Streptococcus gordonii* beschrieben. Weiterhin konnte die Aktivierung von Thrombozyten nur bei *Streptococcus sanguinis* Isolaten nachgewiesen werden (Douglas *et al.*, 1990). Die Pathogenese anderer bedeutender Endokarditiserreger wie *Streptococcus mitis* oder *Streptococcus oralis* bleibt weiter ungeklärt. Zudem stellt sich bei vielen Erkrankungen, die von Oralstreptokokken hervorgerufen werden, die Frage, wie die Bakterien die Abwehrmechanismen des Immunsystems im Blutstrom und Gewebe umgehen. Ob die Bindung an Thrombozyten auch einen antiphagozytischen Mechanismus darstellt, ist nicht geklärt. Über die Ursachen der Entstehung von Gewebsabszessen in inneren Organen wie der Leber (Wagner *et al.*, 2006), der Milz (Lombardi *et al.*, 2008) oder dem Gehirn (Ulivieri *et al.*, 2007), die in den meisten Fällen durch Oralstreptokokken der Anginosusgruppe verursacht werden, ist weiterhin wenig bekannt.

Für obligat pathogene Streptokokkenarten wie *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* oder *Streptococcus pneumoniae* ist hingegen eine ganze Reihe von Adhäsinen, antiphagozytischen Oberflächenproteinen und Exotoxinen beschrieben, auf die die Pathogenität dieser Bakterien zurückgeführt wird (Cunningham, 2000; Liu *et al.*, 2004; Jedrzejewski, 2004). Oberflächenproteine, die die Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronektin (SfbI, SfbII, Fnz, Fnb, GfbA), Kollagen (Cpa) oder Laminin (Lmb) vermitteln, erlauben die Anheftung an menschliche Gewebestrukturen und leiten somit die Kolonisierung ein (Molinari *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1997; Lindmark *et al.*, 1996; Lindgren *et al.*, 1994; Kline *et al.*, 1996; Kreikemeyer *et al.*, 2005; Spellerberg *et al.*, 1999; Nitsche-Schmitz *et al.*, Molecular Biology of Streptococci, 2007). Um der Phagozytose zu entgehen, reichern viele obligat pathogene Streptokokken Fibrinogen durch Bindung an das M-Protein auf der Bakterienoberfläche an (Whitnack *et al.*, 1982; Johansson *et al.*, 2004). Zahlreiche pathogene Streptokokken der pyogenen Gruppe sind darüber hinaus in der Lage, der Opsonisierung durch Immunglobuline aktiv entgegen zu wirken. Es wurden Oberflächenproteine beschrieben, die humane Immunglobuline so auf der Bakterienoberfläche binden (Protein G, Mag, Mig), dass die opsonisierende Wirkung verloren geht (Björck *et al.*, 1984; Nitsche-Schmitz *et al.*, 2007; Jonsson *et al.*, 1994; Vasi *et al.*, 1999). Zudem wurden extrazelluläre bakterielle Proteasen beschrieben (ScpA, ScpB, CppA), die Schlüsselfaktoren des Komplementsystems proteolytisch inaktivieren (Cleary *et al.*, 1992; Angel *et al.*, 1994). Hämolysine stellen einen weiteren antiphagozytischen Mechanismus dar, der bei pathogenen Streptokokken der pyogenen Gruppe beschrieben wurde. Hämolysine aus *Streptococcus pyogenes* (SLO, SLS) sind nicht nur in der Lage, Erythrozyten zu lysieren und die für diese Bakterien typische  $\beta$ -Hämolysen zu verursachen, sondern wirken auch auf Zellen des



Immunsystems zytotoxisch (Goldmann *et al.*, 2009; Timmer *et al.*, 2009). Einige pathogene Streptokokken der pyogenen Gruppe verhindern die effektive Bekämpfung bakterieller Infektionen durch das Immunsystem, indem sie eine überschießende Immunantwort (streptokokkeninduziertes Toxisches Schocksyndrom) induzieren (Proft *et al.*, 2007). Dazu sezernieren die Bakterien sogenannte pyogene Exotoxine und Superantigene (SpeA, SpeC, SpeJ). Um eine schnelle Ausbreitung im Gewebe zu ermöglichen, sezernieren viele obligat pathogene Streptokokken gewebedegradierende Enzyme, die unter dem Begriff Spreading-Faktoren zusammengefasst werden. Dazu gehören unter anderem Proteine (Streptokinasen), die Plasminogen in seine aktive Form überführen und somit kaskadenartig wirtseigene Proteolysesysteme aktivieren (Lähteenmäki *et al.*, 2001). Ebenfalls zu den Spreading-Faktoren zu zählen sind Hyaluronidasen, die das strukturgebende Hyaluronsäurenetzwerk der extrazellulären Matrix degradieren (Starr *et al.*, 2006), und sezernierte Proteasen, die nicht nur Strukturproteine abbauen, sondern auch Signalmoleküle des Immunsystems inaktivieren können (Hidalgo-Grass *et al.*, 2006; Collin *et al.*, 2003).

Die Suche nach solchen oder ähnlichen Virulenzmechanismen in klinisch auffälligen Oralstreptokokkenisolaten stellt neben der Untersuchung der Verteilung bekannter Pathogenitätsfaktoren der Oralstreptokokken einen Ansatz dar, um die Pathogenese dieser Organismengruppe besser verstehen zu lernen.

### 2.3 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Sammlung klinischer Oralstreptokokkenisolate mit Hilfe eines zu entwickelnden speziesübergreifenden Virulenzfaktormicroarrays charakterisiert werden. Die Genausstattung des Microarrays sollte sowohl Aussagen über die Verteilung bekannter Pathogenitätsfaktoren aus Oralstreptokokken als auch die Detektion homologer Virulenzmechanismen aus obligat pathogenen Streptokokkenarten erlauben. Zu diesem Zweck mussten interne Kontrollen und Normalisierungsmethoden entwickelt werden, die eine eindeutige Unterscheidung positiver und negativer Sondensignale ermöglichen und die Vergleichbarkeit einzelner Hybridisierungsexperimente für Clusteranalysen gewährleisten. Dies sollte nicht nur einen Einblick in das Repertoire an Pathogenitätsmechanismen der Oralstreptokokken ermöglichen, sondern auch zur Aufklärung der komplexen phylogenetischen Beziehungen innerhalb dieser Gruppe beitragen.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Verwendete Materialien

Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Riedel de Haën, Serva, Roth, Applichem, Fermentas, New England Biolabs und Sigma bezogen. Für die Anzucht der Bakterien wurden ausschließlich Kulturmedien von Becton Dickinson verwendet. Molekularbiologische Kits stammten von Qiagen und Invitrogen. Spezielle Materialien für die Microarrayanalysen wurden von den Firmen Implen, Perkin-Elmer sowie GE-Healthcare bezogen. Das bioinformatische Design sowie die Synthese sämtlicher Oligonukleotidsonden wurde von der Firma Operon durchgeführt. Primer für Polymerasekettenreaktionen wurden von MWG-Biotech geordert. Kunststoffeinwegmaterialien wurden von den Firmen Greiner und Nunc bezogen.

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) aus einem Milli-Q-System (Millipore) angesetzt.

## 3.2 Verwendete Bakterienstämme

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Einblick in Vorkommen und Verteilung von Virulenzfaktoren innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken zu erlangen. Zu diesem Zweck sollten die Genome humanpathogener Oralstreptokokkenisolate (3.2.1) mit Hilfe eines selbstentwickelten, spezieübergreifenden Microarray nach bekannten und vorhergesagten Virulenzfaktoren aus der Gattung *Streptococcus* durchsucht werden. Für die Entwicklung des Microarrays war zusätzlich eine Auswahl von Bakterienstämmen anderer Streptokokkenarten notwendig (3.2.2).

### 3.2.1 Klinische Oralstreptokokkenisolate

Das Institut für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie des Universitätsklinikum Leipzig erstellte in einem Zeitraum von zwei Jahren eine Sammlung von humanpathogenen Isolaten aus der Gruppe der Oralstreptokokken. Die Spezies-typisierung erfolgte mit Hilfe des API® 20 Strep Systems (BIOMÉRIEUX) und PCR-Methoden (Friedrichs *et al.*, 2007). Die Isolate wurden bei Raumtemperatur auf Wattetupfern ohne Transportmedium (BIOMÉRIEUX) an das Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung verschickt. Die Stammsammlungsliste ist im Anhang dieser Arbeit zu finden (6.3).

### 3.2.2 Weitere Streptokokkenstämme

Für Testhybridisierungen und zu Vergleichszwecken wurden weitere Stämme verschiedener Arten der Gattung *Streptococcus* benötigt. Diese wurden der Stammsammlung der Abteilung Mikrobielle Pathogenität des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung entnommen und sind in Tabelle 3.2.2 aufgeführt.

**Tabelle 3.2.2: Verwendete Teststämme aus der Gattung *Streptococcus*.**

Bezeichnung	Spezies	Referenz
MGAS315	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Beres <i>et al.</i> , 2002
A909	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Tettelin <i>et al.</i> , 2005
R6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Hoskins <i>et al.</i> , 2001
UA159	<i>Streptococcus mutans</i>	Ajdic <i>et al.</i> , 2002

### 3.3 Mikrobiologische Methoden

Für die Analyse der Genome der klinischen Oralstreptokokkenisolate war es notwendig, die erhaltenen Bakterienstämme über einen längeren Zeitraum verlustfrei zu lagern (3.3.1). Die Gewinnung der genomischen DNS aus den Bakterien setzte die Vermehrung (3.3.2) und den Aufschluss der Zellen (3.3.3) voraus.

#### 3.3.1 Langzeitstammhaltung

Für die Erstellung einer Stammsammlung der aus dem Universitätsklinikum Leipzig erhaltenen Streptokokkenisolate wurden diese zunächst auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Feuchtrauminkubator (Thermo Scientific) kultiviert. Die Ausstriche wurden in 15ml THY-Flüssigkulturen überimpft, die Kulturröhrchen fest verschlossen und über Nacht stehend bei 37°C in einem Brutschrank (Heraeus) inkubiert (3.3.2). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 × g pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5804R), einmal mit PBS gewaschen und in 1ml PBS resuspendiert. Ein Aliquot von 750 µl der Bakteriensuspension wurde mit 250 µl steriler Glycerinlösung (87%) vermischt und bei -80°C gelagert.

PBS            1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4)  
                  0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                  8,00 g/l NaCl  
                  0,20 g/l KCl  
                  in dH<sub>2</sub>O

Vor der Verwendung wurde der Puffer durch Autoklavieren für 15 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

#### 3.3.2 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung der humanpathogenen Isolate aus der Gruppe der Oralstreptokokken erfolgte in 15ml des Flüssigmediums THY stehend in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C über Nacht. Die Kulturröhrchen wurden vollständig mit Medium gefüllt und fest verschlossen.

THY            30 g/l THB Fertigmischung  
                 5 g/l Hefeextrakt  
                 in dH<sub>2</sub>O

Vor Gebrauch wurde das Komplexmedium durch Autoklavieren für 15 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

#### 3.3.3 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des DNeasy® Tissue-Kit (QIAGEN) für den Aufschluss grampositiver Zellen auf enzymatisch-chemischem Wege (DNeasy® Tissue Handbook). Die Übernachtskultur (3.3.2) wurde in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804R) bei 4000 × g für 10 min zentrifugiert und der Medienüberstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 460 µl Zellaufschlusspuffer resuspendiert und stehend für 10 bis 50 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit für den Zellaufschluss wurde für jedes Isolat optimiert, um die Präparation möglichst hochmolekularer genomischer DNS zu ermöglichen (3.4.1.1).

Zellaufschlusspuffer        20 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
                                     2 mM EDTA  
                                     1,2% TritonX-100  
                                     in dH<sub>2</sub>O

Vor der Verwendung wurde der Puffer durch Autoklavieren für 15 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Direkt vor dem Zellaufschluss wurden jeweils 50 µl Mutanolysin sowie RNase A hinzugefügt.

Mutanolysin                5000 U/ml  
                                     in 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 6,2)  
                                     in dH<sub>2</sub>O

RNase A                      1 mg/ml  
                                     in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 15 mM NaCl  
                                     in dH<sub>2</sub>O

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

Für die Microarrayanalysen der klinischen Oralstreptokokkenisolate waren sowohl allgemeine molekularbiologische Techniken (3.4.1) als auch spezialisierte Methoden der Microarraytechnologie (3.4.2) notwendig.

#### 3.4.1 Allgemeine Techniken

Bei den allgemeinen Techniken der Molekularbiologie, die im Vorfeld der Microarrayanalysen angewandt wurden, handelte es sich um Methoden zur Gewinnung (3.4.1.1), Reinigung (3.4.1.2) und Analyse (3.4.1.3, 3.4.1.4, 3.4.1.5) von bakterieller genomischer DNS.

##### 3.4.1.1 Präparation genomischer DNS

Die Präparation bakterieller genomischer DNS aus den Zellextrakten (3.3.3) erfolgte mit Hilfe des DNeasy® Tissue-Kit (QIAGEN). Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (DNeasy® Blood & Tissue Handbook) und die aufgereinigte DNS bei -80°C gelagert.

##### 3.4.1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben durchgeführt (QIAquick® Spin Handbook).

##### 3.4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die DNS nach Molekülgröße auftrennt. Dies erfolgte in einer HORIZON® 58 Gelkammer (Gibco) in Gelen mit 1% Agarose im TAE-Puffersystem. Ein Probenaliquot von 6 µl wurde mit 1 µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 40 min bei einer konstanten Spannung von 100 V. Zur Detektion der DNS-Moleküle wurde das Gel für 5 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend für 5 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Ein UV-Transilluminator (Herolab UVT 2020) machte die Ethidiumbromidmoleküle, die sich in die DNS eingelagert hatten, sichtbar. Das Gelbild wurde mit einem EASY-System (Herolab) dokumentiert.

TAE	50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	in dH <sub>2</sub> O

Ladepuffer	TAE 40% Glyzerin 0,05% Xylencyanol in dH <sub>2</sub> O
Ethidiumbromidbad	10 µg/ml Ethidiumbromid in dH <sub>2</sub> O

#### 3.4.1.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion diente der Vervielfältigung definierter DNS-Sequenzbereiche des *16S-rRNA*-Gens mit Hilfe zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 3.4.1.4 gezeigt.

<i>16S-rRNA</i> -fwd	AGAGTTTGATCCTGGCTC	54 °C
<i>16S-rRNA</i> -rev	GGTTACCTTGTTACGACTT	54 °C

**Abbildung 3.4.1.4: Nukleinsäuresequenzen der *16S-rRNA*-Gen-spezifischen Oligonukleotide.** Dargestellt sind die beiden sequenzspezifischen Oligonukleotide zur Amplifikation eines ~1500bp großen Bereichs des *16S-rRNA*-Gens. Die korrespondierende Schmelztemperatur der Oligonukleotide ist rechts angegeben.

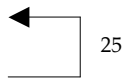
Das Reaktionsvolumen der Polymerasekettenreaktion pro Ansatz wurde auf 50 µl eingestellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist in Tabelle 3.4.1.3.1 angegeben.

**Tabelle 3.4.1.4.1: Zusammensetzung der Polymerasekettenreaktion.**

Bestandteil	Konzentration	Volumen
<i>16S-rRNA</i> -fwd	10 pmol	1,0 µl
<i>16S-rRNA</i> -rev	10 pmol	1,0 µl
genomische DNS	10 ng/µl	1,0 µl
dNTPs	10 mM	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5,0 µl
PCR-Puffer	10 ×	5,0 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,8 µl
dH <sub>2</sub> O		32,2 µl

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem PCR-Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Der Reaktionsablauf ist der Tabelle 3.4.1.3.2 zu entnehmen.

**Tabelle 3.4.1.4.2: Programm der Polymerasekettenreaktion.**

Reaktionsschritt	Reaktionstemperatur	Reaktionszeit	Reaktionszyklen
Anfangsdenaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	40 s	
Anlagerung	52°C	30 s	
Verlängerung	72°C	100 s	
Endverlängerung	72°C	5 min	
Lagerung	4°C	∞	

Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide an die genomische DNS ist abhängig von Länge und Nukleinsäuresequenz der Oligonukleotide und sollte 2°C bis 6°C unter deren Schmelztemperatur liegen. Die Reaktionszeit des Verlängerungsschrittes ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Die verwendete Taq-Polymerase erzeugt einen Komplementärstrang mit einer Geschwindigkeit von ~1000bp/min. Die Anzahl der Reaktionszyklen richtet sich nach der benötigten Menge an Amplifikat und der gewünschten Reaktionsspezifität.

#### 3.4.1.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Der Sequenzierung der amplifizierten *16S-rRNA*-Genbereiche (3.4.1.4) ging eine Kontrolle (3.4.1.3) und Aufreinigung (3.4.1.2) der Amplifikate voraus (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzierung erfolgte mit dem *16S-rRNA*-Gen-spezifischen Oligonukleotid *16S-rRNA*-fwd (Abbildung 3.4.1.4) nach der Big Dye Terminator Methode mit einem ABI Prism® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) und wurde von der Abteilung Genomanalyse des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung durchgeführt. Für jedes analysierte Isolat konnte eine Nukleinsäuresequenz des *16S-rRNA*-Gens mit einer Länge von 680bp ausgewertet werden (3.5.2)

#### 3.4.2 Methoden für Microarrayanalysen

Die Analyse bakterieller genomischer DNS mit einem Microarray erforderte eine Reihe spezieller molekularbiologischer Methoden. Die Nukleinsäuresonden wurden in einer zweckorientierten Anordnung auf den Glasträgern (Slides) immobilisiert (3.4.2.1). Die hochmolekulare, genomische DNS wurde definiert fragmentiert (3.4.2.2), um eine exakte Konzentrationsbestimmung (3.4.2.3) und die Herstellung markierter DNS-Fragmente geeigneter Größe und definierter Menge (3.4.2.4) zu ermöglichen. Nach Zugabe der markierten DNS-Fragmente in das Hybridisierungsgemisch (3.4.2.5) erfolgte die Hybridisierungsreaktion (3.4.2.6), die Färbung der Slides (3.4.2.8) sowie die Detektion der Fluoreszenzsignale (3.4.2.8).

#### 3.4.2.1 Drucken und Blocken der Microarrayslides

Das Drucken der Nukleinsäuresonden auf die Microarrayslides erfolgte mit Hilfe eines MicroGrid II Druckroboters (Biorobotics) durch die Arrayplattform des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung. Nach Immobilisierung der Gensonden auf den Slides durch kovalente Aminkopplung erfolgte das Absättigen freier Estergruppen. Die Prozedur wurde nach Herstellerangaben (User Guide CodeLink™ Activated Slides) durchgeführt.

#### 3.4.2.2 Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNS

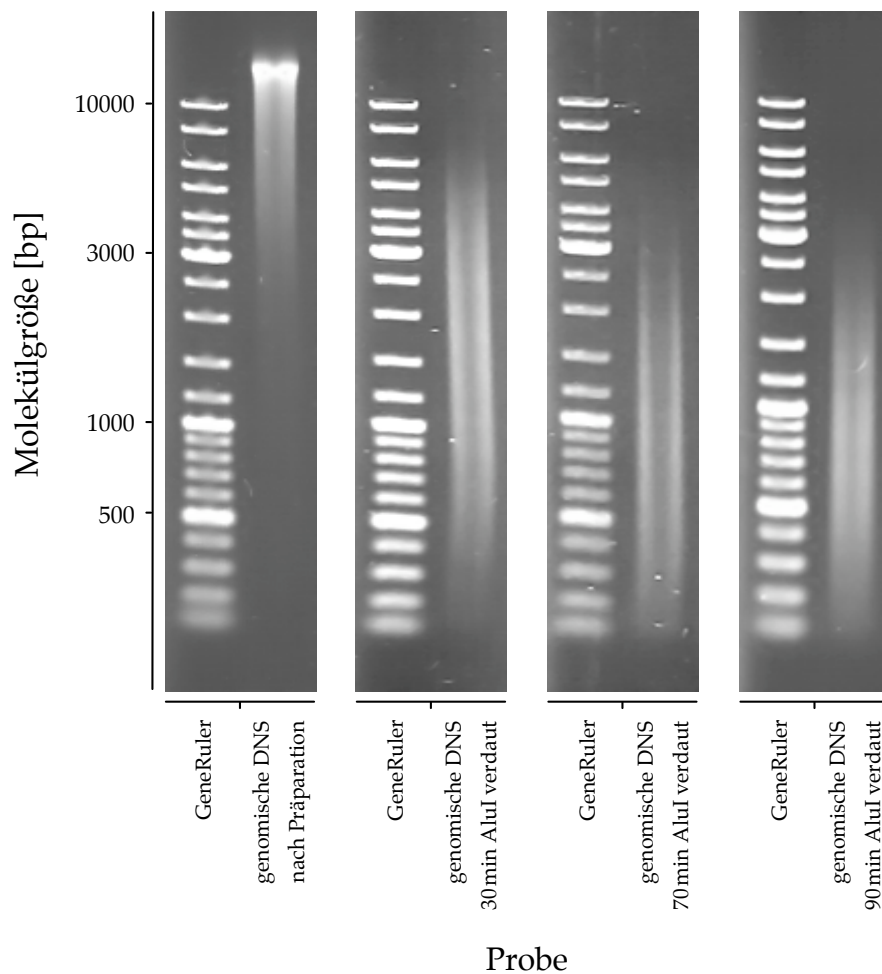
Die Hybridisierung genomischer DNS auf einem Microarray zwecks Detektion der Präsenz einzelner Gene erforderte eine Fragmentierung der hochmolekularen DNS auf die Länge eines repräsentativen Gens des Spenderorganismus. Da die klinischen Oralstreptokokkenisolate unterschiedlichen bakteriellen Spezies angehörten, von denen zum Zeitpunkt der Studie nur wenige Sequenzinformationen vorlagen, wurden Genomlänge und Genanzahl der vier Streptokokkenstämme, auf denen das Design des Microarrays beruhte, für die Abschätzung benutzt. Tabelle 3.4.2.2 zeigt, dass sich daraus ein Schätzwert für die durchschnittliche Länge eines Streptokokkengens von ~1000bp ergibt.

**Tabelle 3.4.2.2: Berechnung der durchschnittlichen Länge eines Streptokokkengens.**

Stammbezeichnung	MGAS315	A909	R6	UA159
Genomlänge [bp]	1900521	2127839	2038615	2030921
Genanzahl	1951	2136	2116	2042
durchschnittliche Genlänge [bp]	~974	~996	~963	~995

Für den Restriktionsverdau wurde die TypII Restriktionsendonuklease AluI benutzt, da diese durch ihre kurze Erkennungssequenz von  $n=4$  im Durchschnitt nach  $4^n=256$  Basenpaaren schneidet und keine überhängenden Enden hinterlässt. Abbildung 3.4.2.2 zeigt, wie durch partiellen enzymatischen Verdau die hochmolekulare genomische DNS auf Fragmentgrößen zwischen 1000bp und 500bp eingestellt wurde.





**Abbildung 3.4.2.2: Partieller enzymatischer Verdau genomischer DNS.** Dargestellt sind Gelbilder von Agarosegelelektrophoresen, die den Fortschritt eines enzymatischen Verdaus bakterieller genomischer DNS des Oralstreptokokkenisolates *Streptococcus constellatus* SV99 mit der Restriktionsendonuklease AluI zeigen. Die Inkubation der genomischen DNS mit dem Restriktionsenzym wurde nach 30 min, 70 min und 90 min unterbrochen und ein Aliquot elektrophoretisch aufgetrennt, um den Fortschritt der Reaktion zu untersuchen. Auf jedem Gelbild ist links der Größenstandard GeneRuler™ Ladder Mix (Fermentas) und rechts die Probe genomischer DNS zu sehen. Die Skalierung des Größenstandards ist ganz links angegeben.

Ein Aliquot von 176  $\mu\text{l}$  der genomischen DNS (3.4.1.1) wurde mit 20  $\mu\text{l}$  NEB2-Puffer und 4  $\mu\text{l}$  des Restriktionsenzym AluI (1:100 in Enzympuffer verdünnt) vermischt und für 25 min bei 37°C unter Schütteln (1000 rpm) in einem Heizblock inkubiert. Die Verdaureaktion wurde durch Kühlung in einem Eiswasserbad gestoppt, ein Aliquot von 6  $\mu\text{l}$  wurde mit 1  $\mu\text{l}$  Ladepuffer vermengt und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.4.1.3), um den Fortschritt der Reaktion zu untersuchen. Der enzymatische Verdau wurde fortgesetzt und durch stichprobenartige Agarosegelelektrophoresen kontrolliert, bis die Fragmentgrößen dem gewünschten Wert zwischen 1000bp und 500bp entsprachen. Anschließend wurde das Restriktionsenzym durch Inkubation der Ansätze in einem Heizblock für 20 min bei 80°C deaktiviert.

Enzympuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
	100 mM KCl
	1 mM DTT
	0,1 mM EDTA
	200 µg/ml BSA
	50% Glyzerin
	in dH <sub>2</sub> O

#### 3.4.2.3 Konzentrationsbestimmung fragmentierter DNS

Die Konzentration hochmolekularer genomischer DNS lässt sich photometrisch nicht fehlerfrei bestimmen. Die Messung wurde daher an der enzymatisch fragmentierten DNS (3.4.2.2) vorgenommen. Um eine korrekte Messung zu gewährleisten, wurde die partiell verdaute DNS vorher von Kontaminationen gereinigt (3.4.1.2). Die Konzentration der partiell verdauten und gereinigten genomischen DNS wurde mit einem BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt.

#### 3.4.2.4 Biotinylierung fragmentierter DNS

Die Detektion hybridisierter Gene auf dem Microarray wurde durch die Herstellung biotinylierter Abschriften der fragmentierten genomischen DNS ermöglicht. Hierfür wurde das BioPrime® DNA Labeling System (Invitrogen) benutzt. Die Zusammensetzung der Biotinylierungsreaktion ist in Tabelle 3.4.2.4 angegeben. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (BioPrime® DNA Labeling System) durchgeführt, die biotinylierte DNS nach der Reaktion aufgereinigt (3.4.1.2) und dem Hybridisierungsgemisch (3.4.2.5) hinzugefügt.

**Tabelle 3.4.2.4: Zusammensetzung der Biotinylierungsreaktion.**

Bestandteil	Konzentration	Volumen
fragmentierte gereinigte DNS	37,5 ng/µl	20 µl
Markierungskontrolloligonukleotid H2NC000006	31,25 pg/µl	2 µl
Markierungskontrolloligonukleotid H2NC000009	125 pg/µl	2 µl
Random Primers Solution	2,5 ×	20 µl
dNTP Mixture	10 ×	5 µl
Klenow Fragment	40 U/µl	1 µl

#### 3.4.2.5 Erstellung des Hybridisierungsgemisches

Die Hybridisierung der fragmentierten, biotinylierten, gereinigten DNS mit den Sonden des Microarrays erfolgte in einem Puffergemisch, dessen Bestandteile stabilisierend auf die DNS wirkten und unspezifische Interaktionen verminderten. Zudem enthielt das Hybridisierungsgemisch, dessen genaue Zusammensetzung Tabelle 3.4.2.5 zu entnehmen ist, die unterschiedlich konzentrierten Hybridisierungskontrolloligonukleotide gelöst in dH<sub>2</sub>O (4.1.4.3).

**Tabelle 3.4.2.5: Zusammensetzung des Hybridisierungsgemisches.**

Bestandteil	Konzentration	Volumen
Hybridisierungspuffer	2×	125 µl
Acetylated BSA	50 mg/ml	2,5 µl
DNA from salmon testes	10 mg/ml	2,5 µl
fragmentierte biotinylierte gereinigte DNS	~15 ng/µl	50 µl
Hybridisierungskontrolloligonukleotid H2NC000001	15,625 pg/µl	2 µl
Hybridisierungskontrolloligonukleotid H2NC000002	31,25 pg/µl	2 µl
Hybridisierungskontrolloligonukleotid H2NC000003	62,5 pg/µl	2 µl
Hybridisierungskontrolloligonukleotid H2NC000004	125 pg/µl	2 µl
Hybridisierungskontrolloligonukleotid H2NC000005	250 pg/µl	2 µl
dH <sub>2</sub> O		60 µl

Die Denaturierung der doppelsträngigen DNS-Fragmente erfolgte in einem Thermocycler (Biometra) für 5 min bei 95°C. Ein Aliquot von 25 µl des Hybridisierungsgemisches wurde für die Hybridisierung eines Microarrays eingesetzt (3.4.2.6).

#### 3.4.2.6 Hybridisierung

Die Hybridisierungsreaktion erfolgte in einem SlideBooster™ SB800 (Advalytix) nach den Vorgaben des Herstellers (User Guide SlideBooster™ SB800). Um die Hybridisierung unterschiedlicher Proben zu ermöglichen, wurde jeder der zwei Microarrays eines Slides einzeln mit einem Deckgläschen 22×25 mm (IMPLEN) abgedeckt. Unter jedes Deckgläschen wurden 25 µl Hybridisierungsgemisch (3.4.2.5) gegeben. Verwendet wurde ein Programm mit einer Mischintensität von 24 und einer Pulsfrequenz von 3s Puls und 7s Pause. Die Hybridisierung wurde bei einer Temperatur von konstant 42°C über einen Zeitraum von 16h durchgeführt.

#### 3.4.2.7 Färbung und Signaldetektion

Nach der Hybridisierung wurden die biotinylierten DNS-Fragmente durch Fluoreszenzmarkierung mit Streptavidin-Cy5 detektiert. Die dafür notwendigen Abläufe nach der Hybridisierung wurden nach Herstellerangaben (Instructions CodeLink™ Gene Expression System) durchgeführt. Die Färbung erfolgte in einem SlideBooster™ SB800 (Advalytix). Benutzt wurden Deckgläschen der Maße 60×25 mm (IMPLEN). Pro Slide wurde ein Aliquot von 50 µl der Färbelösung eingesetzt. Die Färbereaktion erfolgte bei einer Temperatur von konstant 25°C für 30 min mit einer Mischintensität von 27 und einer Pulsfrequenz von 3s Puls und 7s Pause. Der Nachweis der markierten DNS-Fragmente wurde durch die Anregung der gebundenen Cy5-Moleküle (649 nm) und die Detektion der emittierten Fluoreszenz (670 nm) ermöglicht. Dies erfolgte in einem arrayWoRx® biochip reader (AppliedPrecision®).

### 3.5 EDV-Methoden

Die Entwicklung und Anwendung des speziesübergreifenden Microarrays erforderte die Verwendung verschiedener Computerprogramme und Datenbanken für die Selektion der Gene (3.5.1), die Analyse von Nukleinsäuresequenzen (3.5.2) und die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse (3.5.3).

#### 3.5.1 Selektion der Streptokokkengene für den Microarray

Die Auswahl der Streptokokkengene, deren Präsenz in bakteriellen Genomen mit Hilfe des Microarrays untersucht werden sollte, erfolgte anhand von zwei Methoden. Die Genome von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159 wurden nach Sequenzen durchsucht, die für extrazelluläre Proteine codieren (3.5.1.1). Zusätzlich wurden Gene virulenzassoziierter oder extrazellulärer Proteine aus der Gruppe der Oralstreptokokken und der Gruppe der G- und C-Streptokokken ausgewählt (3.5.1.2).

##### 3.5.1.1 Auswahl von Genen extrazellulärer Proteine

Die Genome der vier Teststämme *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159 wurden nach Sequenzen durchsucht, die für potenziell extrazelluläre Proteine codieren. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen aller offenen Leserahmen dieser Genome mit Hilfe des Programmes SignalP 3.0 (CBS) untersucht. Dieses Programm nutzt einen Algorithmus (von Heijne, 1986) zur Vorhersage von Signalpeptiden in Proteinen grampositiver Bakterien. Sequenzen, für die ein Signalpeptid vorhergesagt wurde, wurden mit dem Programm SOSUI/G 1.1 (Mitaku Group) auf Transmembrandomänen durchsucht. Um nicht einen Großteil der Transmembranproteine, die für den zellulären Transport verantwortlich sind, in die Auswahl für den Microarray zu übernehmen, wurden nur Gene ausgewählt, deren Aminosäuresequenzen ein Signalpeptid und nicht mehr als zwei Transmembrandomänen aufwiesen.

##### 3.5.1.2 Auswahl zusätzlicher Gene

Zusätzlich wurden Streptokokkengene in die Auswahl aufgenommen, die für beschriebene extrazelluläre Proteine oder Virulenzfaktoren codieren. Dafür wurden die Protein- und Gendatenbanken von Oralstreptokokken der Arten *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* und *Streptococcus salivarius* sowie von *Streptococcus dysgalactiae* spp. *equisimilis* und *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus* aus der Gruppe der G- und C-Streptokokken durchsucht.

### 3.5.2 Sequenzanalysen

Die Analyse von Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken oder Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe des Programms BioEdit 7.0.8 (Ibis Biosciences). Die Alignmentfunktion erlaubte vergleichende Sequenzbetrachtungen, die mit dem Programm MEGA 4.0.2 (The Biodesign Institute) grafisch dargestellt wurden. Mit Hilfe dieser Alignmentfunktion wurden auch die Oligonukleotide für Polymerasekettenreaktionen erstellt. Datenbankvergleiche von Nukleinsäuresequenzen erfolgten mit dem Programm blastn (National Center for Biotechnology Information).

### 3.5.3 Signalverarbeitung

Nachdem die Sondensignale der hybridisierten Microarrayslides ausgelesen waren (3.4.2.8), lagen sie in Form von digitalen Bilddaten vor. Für die Analyse der Hybridisierungsergebnisse wurden die Fluoreszenzsignale zu Datensätzen bestehend aus Sondenbezeichnung und korrespondierenden Intensitätswerten für Signal und Hintergrund umgeformt (3.5.3.1). Diese Datensätze wurden für vergleichende Clusteranalysen normalisiert (3.5.3.2) oder für die Einzelgenauswertung in binäre Präsenz-Absenz-Daten umgeformt (3.5.3.3).

#### 3.5.3.1 Auslesen der Fluoreszenzintensitäten

Die Ergebnisse der Microarrayhybridisierungen lagen nach dem Auslesen der Slides (3.4.2.7) in Form von digitalen Bilddateien (Tagged Image File) vor. Mit Hilfe des Programms ImaGene 5.5 (BioDiscovery) wurde ein Raster über die Bilddatei gelegt, das jedem Spot auf dem Microarray die entsprechende Sondenbezeichnung zuordnete. Das Ausrichten des Rasters anhand der Pinarrays erfolgte manuell. Die Anpassung von Position, Größe und Form der einzelnen Spots sowie das Auslesen der Signalinformationen wurde von der Software durchgeführt. Spots, die von der gedruckten Kreisform abwichen oder deren Fluoreszenzsignale auf Grund von Kontaminationen nicht ausgelesen werden konnten, wurden manuell als fehlerhaft gekennzeichnet. Die Signalinformationen wurden im softwarespezifischen SST-Format gespeichert und mit dem Programm GeneSight 3.5.1 (BioDiscovery) weiterbearbeitet. Als fehlerhaft gekennzeichnete Einträge wurden automatisch aus dem Datensatz entfernt und dieser in das offene TXT-Textdateiformat umgewandelt.

#### 3.5.3.2 Normalisierung und Clusteranalysen

Um die Beziehungen zwischen den verschiedenen Streptokokkenarten analysieren zu können, wurde die Vergleichbarkeit der Hybridisierungsergebnisse verschiedener Microarrayanalysen auf mathematischem Wege ermöglicht (4.1.5.1). Dafür wurden Tabellenvorlagen für das Programm Excel 2000 (Microsoft®) entwickelt, in die die

bereinigten Datensätze (3.5.3.1) geladen wurden. Die Signalinformationen wurden automatisch nach Pinarray und Genbezeichnung sortiert. Die vier Replikate jeder Gen- und Kontrollsonden wurden durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts zusammengefasst. Die Normalisierung der Signalintensitäten erfolgte anhand der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Pufferkontrolle (4.1.2.3 und 4.1.2.4). Aus den arithmetischen Mittelwerten der Signalintensitäten wurde für jede Kontrolle der Mittelwert über den gesamten Datensatz berechnet. Anhand dieser Mittelwerte wurden die Signalintensitäten jeder Microarrayhybridisierung des Datensatzes normalisiert (4.1.5.1). Die so umgeformten Daten wurden im offenen TXT-Textdateiformat gespeichert.

Um die Beziehungen zwischen den analysierten Isolaten aus der Gruppe der Oralstreptokokken zu untersuchen, wurden vergleichende Clusteranalysen durchgeführt. Die normalisierten Datensätze wurden mit Hilfe des Programms MeV 4.2 (TM4 Software Suite) nach Isolat und Gen geclustert. Als Distanzmatrix wurde die Pearson-Korrelation gewählt, als Verknüpfungsmethode Average-Linkage.

#### 3.5.3.3 Schwellenwertberechnungen und Einzelauswertung

Um Vorkommen und Verteilung von virulenzrelevanten Genen innerhalb der analysierten Streptokokkenisolate zu untersuchen, war eine Umformung der Fluoreszenzintensitäten in eindeutige Präsenz-Absenz-Aussagen nötig (4.1.5.2). Tabellenvorlagen für das Programm Excel 2000 (Microsoft®) wurden entwickelt, in die die bereinigten Datensätze (3.5.3.1) geladen wurden. Die Signalinformationen wurden automatisch nach Pinarray und Genbezeichnung sortiert. Die vier Replikate jeder Gen- und Kontrollsonde wurden durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts zusammengefasst. Für jeden Pinarray wurde der Schwellenwert als das 1,5-fache des arithmetischen Mittelwertes aller Replikate der vier Spezifitätskontrollen festgelegt (4.1.5.2). Alle Gene, deren arithmetischer Mittelwert der vier Gensondenreplikate, reduziert um die korrespondierende Standardabweichung, größer war, als der berechnete Schwellenwert, wurden als im Genom vorhanden gewertet. Die Datensätze wurden dadurch in eine binäre Form umgeschrieben, die die weitere Auswertung ermöglichte. Die Auswertung und grafische Darstellung der digitalisierten Datensätze (3.5.3.3) erfolgte mit Hilfe verschiedener Filter-, Zähl- und Sortierfunktionen des Programms Excel 2000 (Microsoft®).

## 4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Einblick in die phylogenetischen Beziehungen und das Repertoire an Pathogenitätsmechanismen der Oralstreptokokken zu erlangen. Hierfür wurde ein speziesübergreifender Virulenzfaktormicroarray entwickelt (4.1) und eine Sammlung klinischer Oralstreptokokkenisolate mit diesem untersucht (4.2). Eine zusammenfassende Projektübersicht ist im Anhang dieser Arbeit (6.1) zu finden.

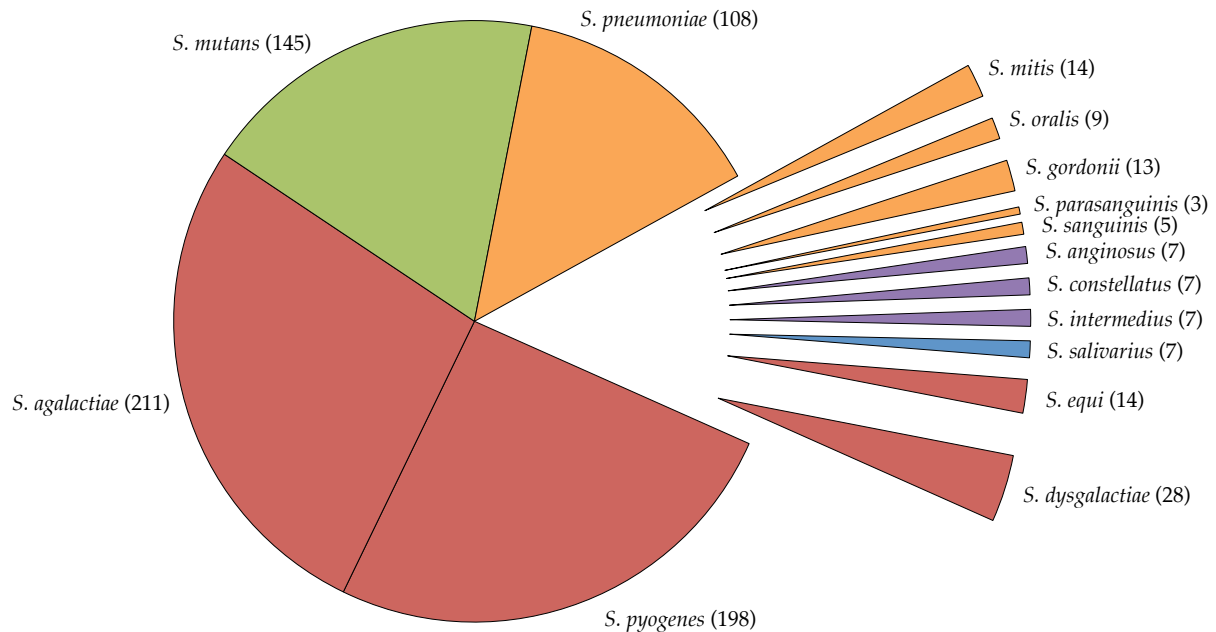
### 4.1 Entwicklung des Microarrays

Die Entwicklung des speziesübergreifenden Virulenzfaktormicroarrays kann zu fünf Schritten zusammengefasst werden. Die Gene, deren Präsenz in bakteriellen Genomen mit Hilfe des Microarrays untersucht werden sollte, wurden ausgewählt (4.1.1). Es wurden interne Kontrollen entwickelt, die die Vergleichbarkeit der Microarrayanalysen gewährleisteten und eine eindeutige Interpretation ermöglichten (4.1.2). Eine zweckdienliche Anordnung der entwickelten Streptokokkengensonden und Kontrollsonden innerhalb des Microarrays wurde ausgearbeitet (4.1.3). Im Rahmen der Methodenentwicklung der Hybridisierung wurden durch Testhybridisierungen die Kontrollen eingestellt sowie die optimale Menge an genomischer DNS pro Hybridisierung ermittelt (4.1.4). Mathematische Methoden zur Signalnormalisierung und Auswertung wurden entwickelt (4.1.5).

#### 4.1.1 Auswahl der Streptokokkengene

Die Auswahl der Streptokokkengene für den speziesübergreifenden Microarray erfolgte durch zwei unabhängige Methoden. Aus vier Arten der Gattung *Streptococcus*, die basierend auf 16S-rRNA-Gensequenzanalysen (Kawamura *et al.*, 1995) phylogenetisch maximal voneinander entfernt sind, wurde jeweils ein Bakterienstamm ausgewählt, von dem vollständige Genomsequenzinformationen zugänglich waren. Die proteincodierenden Sequenzen der Genome dieser Stämme wurden mit Hilfe geeigneter Computerprogramme (6.1) nach Kriterien von Signalpeptiden grampositiver Bakterien sowie nach Transmembranbereichen durchsucht. Alle vorhergesagten proteincodierenden Bereiche, deren Aminosäuresequenz ein Signalpeptid und nicht mehr als zwei Transmembrandomänen aufwiesen, wurden in die Genauswahl für den Microarray aufgenommen (Methode 1). Zusätzlich zu dieser Auswahl wurden Gene aus der Gruppe der Oralstreptokokken sowie der Gruppe der G- und C-Streptokokken ausgewählt, wenn diese bereits als extrazelluläres Protein oder Virulenzfaktor beschrieben waren (Methode 2). Die endgültige Genauswahl umfasste 776 Gene aus 15 verschiedenen Arten der Gattung *Streptococcus* und ist im Anhang der Arbeit zu finden (6.4). Der größte Teil der Gene stammte aus den vier Stämmen *Streptococcus pyogenes* MGAS315,

*Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159, die das Grundgerüst der Genauswahl bildeten (Methode 1). Die zusätzlich ausgewählten Virulenzfaktorgene aus anderen Streptokokkenarten (Methode 2) stellten zusammen ~20% der Gesamtauswahl dar. Abbildung 4.1.1. zeigt die Verteilung der Genauswahl, die nach Ursprungsspezies der Gene geordnet ist.



**Abbildung 4.1.1: Genauswahl für den Microarray.** Dargestellt ist ein Überblick über die Auswahl der Gene für den Microarray. Bezeichnet ist die jeweilige Streptokokkenart sowie die Anzahl der Gene, die selektiert wurden (in Klammern). Die Farbdarstellung fasst die Arten entsprechend der Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* zusammen. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot).

### 4.1.2 Entwicklung interner Kontrollen

Der speziesübergreifende Microarray wurde für zwei Aufgabenstellungen entwickelt. Zum einen für vergleichende Betrachtungen, um die phylogenetischen Beziehungen zwischen den untersuchten Streptokokkenarten zu analysieren, zum anderen, um Einblicke in Genvorkommen und Genverteilung innerhalb der analysierten Isolate zu ermöglichen. Für die Bearbeitung der ersten Aufgabenstellung war es unerlässlich, eine Vergleichbarkeit der Daten aus verschiedenen Hybridisierungsexperimenten herzustellen. Dazu mussten Kontrollen, die einen Ausgleich experimenteller Abweichungen ermöglichten, entwickelt werden (4.1.2.1 bis 4.1.2.3). Für die Bearbeitung der zweiten Aufgabenstellung waren weitere Kontrollen nötig, die es erlaubten, zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen zu unterscheiden. Mit diesen Kontrollen sollte die Berechnung eines Schwellenwertes ermöglicht werden, um Fluoreszenzintensitäten in eindeutige Präsenz-Absenz-Aussagen umformen zu können (4.1.2.4).



### 4.1.2.1 Genomkontrollen

Die Überprüfung von Qualität und Quantität der präparierten und fragmentierten bakteriellen DNS erfolgte bei jeder Microarrayanalyse durch integrierte Genomkontrollen. Bei diesen Kontrollen handelte es sich um Nukleinsäuresonden, die gegen drei hochkonservierte bakterielle Gene gerichtet waren: das *16S-rRNA*-Gen, das *23S-rRNA*-Gen sowie das *eno*-Gen. Vergleichende Sequenzanalysen dieser Gene aus verschiedenen Streptokokkenarten ermöglichten die Identifizierung hochgradig homologer Bereiche, die als spezieübergreifende Sonden geeignet waren. Wie in Abbildung 4.1.2.1 gezeigt, sind die Sequenzen der *16S-rRNA*-Sonde sowie der *23S-rRNA*-Sonde zwischen den getesteten Arten der Gattung *Streptococcus* vollständig konserviert, was eine effektive Kontrolle der zu analysierenden bakteriellen Genome ermöglichte. Die Sequenzanalyse des Genbereichs der *eno*-Sonde zeigt im Vergleich zu den *rRNA*-Sonden mehr Variabilität zwischen den Streptokokkenarten.

16S-rRNA-Sonde	[AminoC6] AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315	.....
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	.....
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	.....
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	.....
23S-rRNA-Sonde	[AminoC6] CGGCCGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAAGTTCCG
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315	.....
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	.....
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	.....
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	.....
eno-Sonde	[AminoC6] TTACAGC-TACCTTGGTGGATTCAACACTAAAGTTCTTCCAACCTCCAATGATGAAC
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315	.....-•T.....•C.....•T.....
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	.....-.....
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	.....-.....
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	.....-.....•T.....•G.....

**Abbildung 4.1.2.1: Nukleinsäuresequenzen der Genomkontrollsonden.** Dargestellt sind Sequenzvergleiche der Nukleinsäuresequenzen der *16S-rRNA*-Sonde, der *23S-rRNA*-Sonde sowie der *eno*-Sonde mit den korrespondierenden Genbereichen der Teststämme *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159. Konservierte Basen sind durch einen Punkt (•), Lücken in der Sequenz durch einen Strich (-) gekennzeichnet.

### 4.1.2.2 Markierungskontrollen

Fluoreszenzsignale ermöglichten Detektion und Vergleich der hybridisierten DNS-Fragmente. Die Intensität dieser Signale ist abhängig von der Effizienz der Markierung der DNS-Fragmente. Um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Hybridisierungsexperimenten herzustellen, wurde die Markierungseffizienz der fragmentierten bakteriellen Genome durch sogenannte Spiked-In Kontrollen überprüft. Dabei handelte es sich um zwei Oligonukleotidsonden, die nicht mit bekannten Sequenzen aus der Gattung *Streptococcus* hybridisieren (Abbildung

4.1.2.2.1). Oligonukleotide derselben Sequenz (Abbildung 4.1.2.2.2) wurden in definierten Mengen in dH<sub>2</sub>O gelöst der Markierungsreaktion hinzugefügt, sodass komplementäre biotinylierte Oligonukleotide synthetisiert wurden. Die Fluoreszenzintensitäten dieser zwei Kontrollen nach Hybridisierung und Färbereaktion erlaubten Rückschlüsse auf die Markierungseffizienz der fragmentierten bakteriellen Genome. Abweichungen in den Signalintensitäten, hervorgerufen durch Varianzen im experimentellen Ablauf der Markierungsreaktion, konnten dadurch überwacht und mathematisch ausgeglichen werden.

H2NC000006-Sonde

[AminoC6] CACAAACGCGTCTGAGTAACGGGCGCCCTATGGTCGGAGCGGACACACGTTCTAATAAGAATCTGACCT

H2NC000009-Sonde

[AminoC6] TAACCAAGTTATTGCGCACCGAGTCAAAGTCGGACGTGATCCCGGTTTCGACGGGCTAATGGGCAAGGTC

**Abbildung 4.1.2.2.1: Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrollsonden.** Dargestellt sind die 69bp-langen Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrollsonden, die über einen AminoC6-Anker auf dem Slide immobilisiert wurden.

H2NC000006-Oligonukleotid

ACAAACGCGTCTGAGTAACGGGCGCCCTATGGTCGGAGCGGACACACGTTCTAATAAGAATCTGACCT

H2NC000009-Oligonukleotid

AACCAAGTTATTGCGCACCGAGTCAAAGTCGGACGTGATCCCGGTTTCGACGGGCTAATGGGCAAGGTC

**Abbildung 4.1.2.2.2: Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrolloligonukleotide.** Dargestellt sind die 68bp-langen Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrolloligonukleotide, die vor der Markierungsreaktion in verschiedenen Mengen der fragmentierten genomischen DNS hinzugefügt wurden.

### 4.1.2.3 Hybridisierungskontrollen

Die experimentelle Durchführung der Hybridisierungsreaktion stellte eine weitere Quelle für interexperimentelle Signalabweichungen dar. Um die Vergleichbarkeit verschiedener Hybridisierungsexperimente zu gewährleisten, wurde die experimentelle Durchführung mit Hilfe von fünf Spiked-In Kontrollen überwacht. Die Nukleinsäuresequenzen dieser Sonden wurden so gewählt, dass keine Hybridisierung mit bekannten Sequenzen aus Streptokokken stattfand (Abbildung 4.1.2.3.1). Vor jeder Hybridisierung wurden standardisierte Mengen der in dH<sub>2</sub>O gelösten komplementären 5'-biotinylierten Oligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Anhand der Fluoreszenzintensitäten dieser Kontrollen wurden Varianzen in den Signalintensitäten verschiedener Hybridisierungsexperimente erkannt und mathematisch ausgeglichen (4.1.5.1)

## 4 Ergebnisse

---

### H2NC000001-Sonde

[AminoC6] GTCACATGCGATGGATCGAGCTCCTTTATCATCGTTCCACCTTAATGCACGGACGAGGCCGGTATGTT

### H2NC000002-Sonde

[AminoC6] TCATTCGATCGGGACGAACGCTAGAACCTTGACTTAGCTACTAATAAGTTCCGTTTGTATCGCAAATGC

### H2NC000003-Sonde

[AminoC6] TTTCTTGACTCGGACATCCGCGCTATGCGCTAGGGTACCGTTACTGGTCACGGTTATCGCTGAACTCGG

### H2NC000004-Sonde

[AminoC6] ACACGAACGACGTTATGGGCCCCATACGAATCAGAATCGAGTAACCTTTTGCGCGTTGGCCCGCCCCAG

### H2NC000005-Sonde

[AminoC6] AACTAAGTGCTATATGAGGTATCGTCGTTTATGTGCGGACGAGCAACATGCGGTGGGTATATGCAAGAC

**Abbildung 4.1.2.3.1: Nukleinsäuresequenzen der Hybridisierungskontrollsonden.** Dargestellt sind die 69bp-langen Nukleinsäuresequenzen der Markierungskontrollsonden, die über einen AminoC6-Anker auf dem Slide immobilisiert wurden.

### H2NC000001-Oligonukleotid

[5' Biotin] AACATACCGGCCTCGTCCGTGCATTAAGGTGGGAACGATGATAAAGGAGCTCGATCCATCGCATGTGA

### H2NC000002-Oligonukleotid

[5' Biotin] GCATTTGCGATACAAACGGAACCTATTAGTAGCTAAGTCAAGGTTCTAGCGTTTCGTCGCCGATCGAATG

### H2NC000003-Oligonukleotid

[5' Biotin] CCGAGTTCAGCGATAACCGTGACCAGTAACGGTACCCTAGCGCATAGCGGGATGTCCGAGTCAAGAA

### H2NC000004-Oligonukleotid

[5' Biotin] CTGGGGCGGGCCAACGCGCAAAAGGTTACTCGATTCTGATTTCGTATGGGGCCCATACGTCGTTTCGTG

### H2NC000005-Oligonukleotid

[5' Biotin] GTCTTGCAATATACCCACCGCATGTTGCTCGTCGCGACATAAACGACGATACCTCATATAGCACTTAGT

**Abbildung 4.1.2.3.2: Nukleinsäuresequenzen der Hybridisierungskontrolloligonukleotide.** Dargestellt sind die 68bp-langen Nukleinsäuresequenzen der 5'-biotinylierten Hybridisierungskontrolloligonukleotide, die vor der Hybridisierung in verschiedenen Mengen dem Hybridisierungsgemisch hinzugefügt wurden.

### 4.1.2.4 Spezifitätskontrollen

Eine weitere Aufgabe des entwickelten Microarray war es, Aussagen über Vorkommen und Verteilung von virulenzrelevanten Genen innerhalb der Gattung *Streptococcus* zu ermöglichen. Dazu war es notwendig, die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Gensonden in eindeutige Präsenz-Absenz Aussagen umzuwandeln. Kontrollen, die zwischen spezifischer und unspezifischer Signalintensität unterscheiden ließen, waren dafür essentiell. Es wurden vier Oligonukleotidsonden entwickelt, deren Nukleinsäuresequenzen mit keiner bekannten Sequenz aus der Gattung *Streptococcus* hybridisieren (Abbildung 4.1.2.4). Die Fluoreszenzsignale dieser Kontrollsonden ermöglichten für jede Hybridisierung die Berechnung eines Schwellenwertes zur Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Signalen (4.1.5.2). Als zusätzliche Kontrolle wurden Druckpufferspots ohne Oligonukleotidsonden gedruckt. Diese Druckpufferkontrollen hatten zwei Aufgaben. Zum einen dienten sie der Detektion unspezifischer Interaktionen zwischen den

hybridisierten DNS-Fragmenten und Druckpufferkomponenten. Zum anderen lieferten sie die Nullpunkt看te für die mathematische Korrektur experimenteller Varianzen (4.1.5.1).

H2NC000007-Sonde

[AminoC6] ATGTTGGAAACATTGTGAGTTCGTCCAGCAAGCGAGGCCTTGGGCGTAAACGACATTATGGGAGAGAC

H2NC000008-Sonde

[AminoC6] CGTCCCGTATTTTGGACGTGAAAGGTGTCGCCTCTTGAACACGATTCTCCCGCCATGGTCTTAATGAG

H2NC000010-Sonde

[AminoC6] GGGCCGTGAGCTAACTGTAAATAACTATCCAGATACTGACACGTCAACGCCGGCGCTACCGGTCGAA

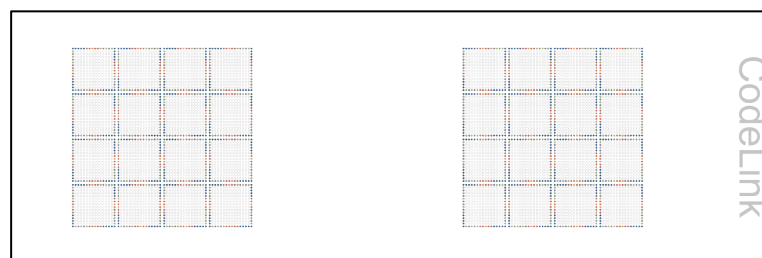
H2NC000011-Sonde

[AminoC6] ATTACTATGATATGAACCCACAGCTCAAATACATCTGTGTCTGTATCGCAACAACCCAGTCTTCCCCA

**Abbildung 4.1.2.4: Nukleinsäuresequenzen der Spezifitätskontrollsonden.** Dargestellt sind die Nukleinsäuresequenzen der Spezifitätskontrollsonden, die über einen AminoC6-Anker auf dem Slide immobilisiert wurden.

### 4.1.3 Sondenordnung innerhalb des Microarrays

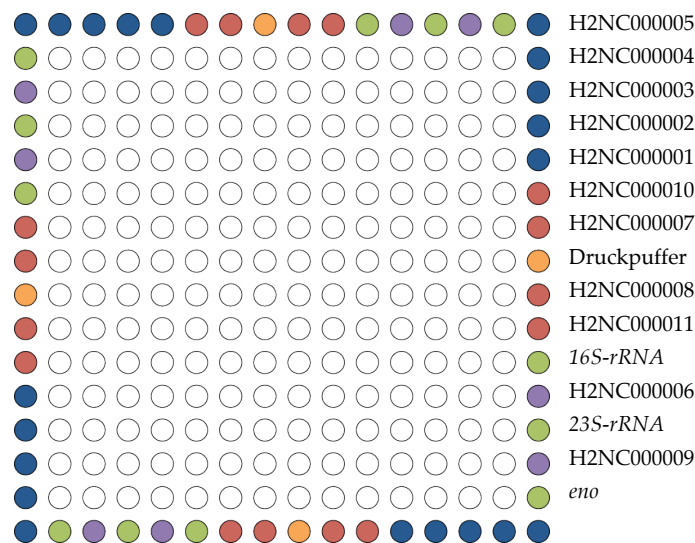
Die Anordnung der verschiedenen Kontrollsonden sowie der ausgewählten Gensonden auf dem Slide war für Handhabung und Auswertung des Microarrays von großer Bedeutung. Zudem musste die geplante Sondenordnung mit den Möglichkeiten des Druckroboters kompatibel sein. Auf jedem Slide wurden zwei Microarrays in ausreichendem Abstand zueinander gedruckt. Um die große Anzahl an Sonden in einem Microarray zusammenfassen zu können, wurde ein Druckaufsatz mit 16 Nadeln benutzt, was in einer quadratischen Anordnung von  $4 \times 4$  Pinarrays pro Microarray resultierte. Abbildung 4.1.3.1 zeigt die schematische Darstellung eines Slides mit zwei Microarrays und jeweils 16 Pinarrays.



**Abbildung 4.1.3.1: Schematische Darstellung eines Microarrayslides.** Jeder Microarray besteht aus 16 Pinarrays in einer  $4 \times 4$  Anordnung. Jeder Pinarray umfasst 256 Spots in einer Anordnung von  $16 \times 16$ .

Jeder Pinarray sollte alle drei Genomkontrollen, alle zwei Markierungskontrollen, alle fünf Hybridisierungskontrollen, alle vier Spezifitätskontrollen und eine Druckpufferkontrolle beinhalten. Somit wurden für einen Microarray mit 16 Pinarrays 240 Spots von Kontrollsonden besetzt. Zusammen mit 776 Gensonden

umfasste ein Microarray 1016 verschiedene Oligonukleotidsonden. Der benutzte Druckroboter konnte innerhalb eines Microarrays Pinarrays mit einer Kantenlänge von maximal  $16 \times 16$  Spots drucken, was einer Gesamtheit von 4096 Spots pro Microarray entspricht. Somit war es möglich, jede Oligonukleotidsonde in vier Replikaten zu drucken. Um eine automatisierte Bildauswertung zu ermöglichen, wurden die Kontrollsonden in Form eines Rahmens um jeden Pinarray gedruckt, was die optische Separation der sehr nah beieinanderliegenden Pinarrays erleichterte. Die Anordnung der vier Replikate der Kontrollsonden innerhalb eines Pinarray wird in Abbildung 4.1.3.2 verdeutlicht.



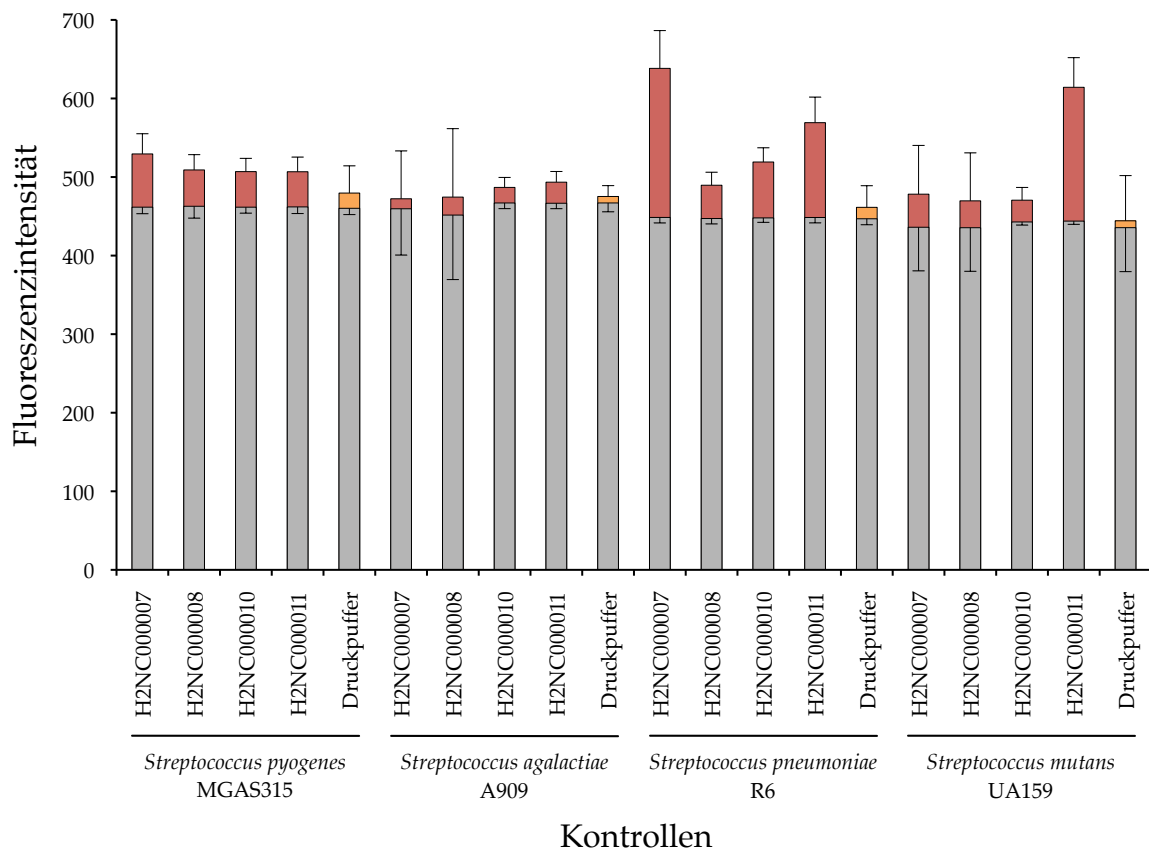
**Abbildung 4.1.3.2: Schematische Darstellung eines Pinarrays.** Dargestellt ist die Anordnung der Genomkontrollsonden (grün), Markierungskontrollsonden (violett), Hybridisierungskontrollsonden (blau), Spezifitätskontrollsonden (rot) sowie der Druckpufferkontrolle (gelb). Die auf der rechten Seite aufgeführte Anordnung wiederholt sich auf den anderen drei Außenkanten des Pinarrays. Der innere Bereich des Pinarrays beinhaltet die Gensonden (weiss).

### 4.1.4 Testhybridisierungen

Nachdem die theoretischen Arbeiten am Design des Microarray abgeschlossen waren, wurden Testhybridisierungen durchgeführt. Die optimale Menge an bakterieller DNS pro Hybridisierungsexperiment wurde bestimmt (4.1.4.1). Es wurde überprüft, ob die entwickelten speziesübergreifenden Genomkontrollen zuverlässig arbeiteten (4.1.4.2). Für die Spiked-In Kontrollen musste die optimale Menge an Oligonukleotiden bestimmt werden, um die Markierungsreaktion und die Hybridisierung effizient überwachen zu können (4.1.4.3). Da der größte Teil der Gene auf dem Microarray aus den vier Streptokokkenstämmen *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 stammte, wurden die Testhybridisierungen mit der genomischen DNS dieser vier Teststämme durchgeführt.

### 4.1.4.1 Einstellung der Hybridisierungsmenge der genomischen DNS

Um den Intensitätsbereich des Fluoreszenzdetektors (3.4.2.8) mit den Signalen der hybridisierten DNS-Fragmente effizient zu nutzen, wurde die Menge an bakterieller DNS pro Hybridisierungsreaktion optimiert. Verschiedene Massen fragmentierter genomischer DNS wurden in die Markierungsreaktion (3.4.2.4) eingesetzt. Bei der anschließenden Aufreinigung (3.4.1.2) wurde das Volumen der biotinylierten Oligonukleotide so eingestellt, dass diese vollständig in das Hybridisierungsgemisch (3.4.2.5) übernommen werden konnten. Abbildung 4.1.4.1 zeigt die Fluoreszenzintensitäten der Spezifitätskontrollen, der Druckpufferkontrollen sowie korrespondierender Hintergrundaktivitäten der Hybridisierungen von jeweils 25 µl des Hybridisierungsgemisches (3.4.2.5), zu dessen Herstellung jeweils 750 ng der fragmentierten genomischen DNS der vier Teststämme (MGAS315, A909, R6, UA159) in die Markierungsreaktion (3.4.2.4) eingesetzt wurden.

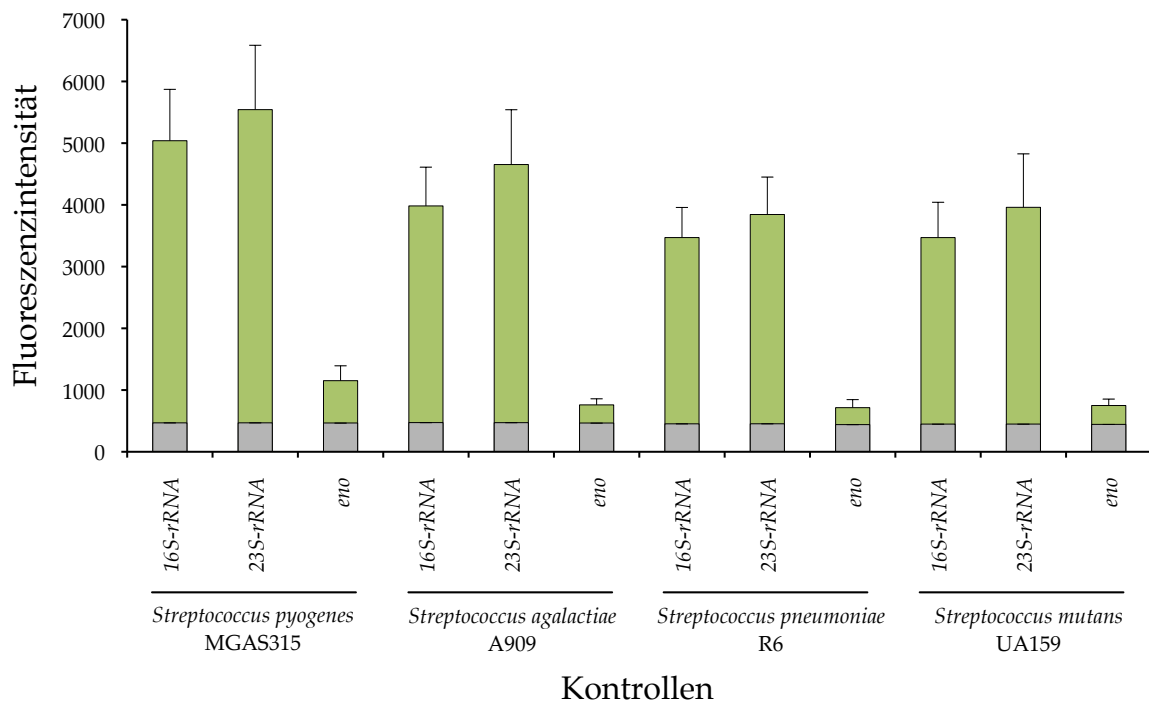


**Abbildung 4.1.4.1: Einfluss der Hybridisierungsmenge der genomischen DNS auf die Fluoreszenzintensität der Spezifitätskontrollen.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale aller Spezifitätskontrollen (rot), Druckpufferkontrollen (gelb), und korrespondierender Hintergrundaktivitäten (grau) gemittelt über den gesamten Microarray. Jeweils 750 ng der fragmentierten genomischen DNS der vier Teststämme (MGAS315, A909, R6, UA159) wurden in die Markierungsreaktion eingesetzt und anschließend 25 µl des Hybridisierungsgemisches auf jeweils einem Microarray hybridisiert.

In einer Reihe von Testhybridisierungen mit verschiedenen Mengen genomischer DNS (Daten nicht gezeigt) erwies sich eine Masse von 750ng fragmentierter genomischer DNS pro Markierungsreaktion als optimal. Die Spezifitätskontrollen zeigten bereits geringe unspezifische Reaktionen, zu erkennen an Fluoreszenzsignalen deutlich über der Hintergrundaktivität. Die Hybridisierung anderer Mengen von genomischer DNS hätte den maximal nutzbaren Intensitätsbereich eingeschränkt.

### 4.1.4.2 Überprüfung der Genomkontrollen

Die phylogenetischen Abstände zwischen *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159 stellten für den entwickelten Microarray Extreme dar, die eine umfassende Erprobung der spezieübergreifenden Genomkontrollen ermöglichten. Abbildung 4.1.4.2 zeigt die Fluoreszenzsignale der Genomkontrollen nach Hybridisierung von 25 µl des Hybridisierungsgemisches (3.4.2.5), zu dessen Herstellung jeweils 750ng der fragmentierten genomischen DNS der vier Teststämme (MGAS315, A909, R6, UA159) in die Markierungsreaktion (3.4.2.4) eingesetzt wurden.

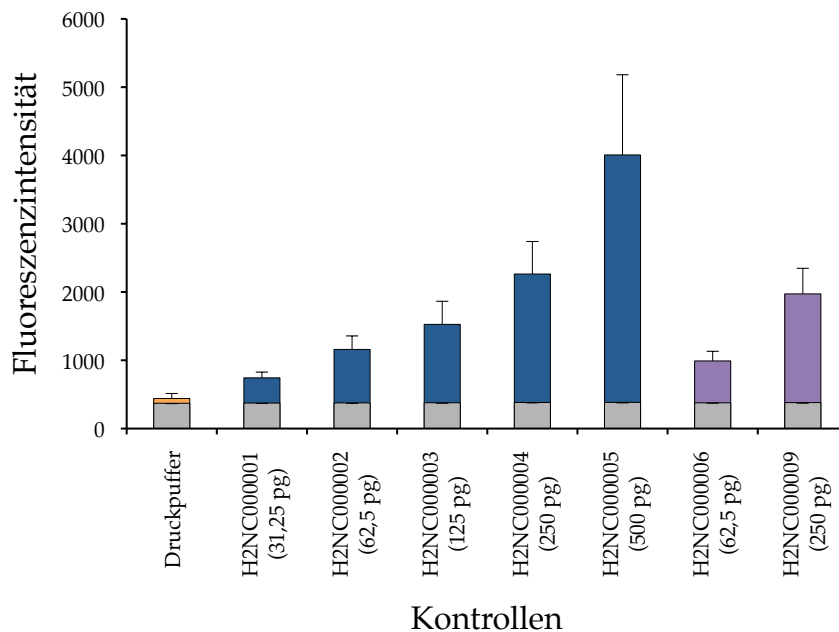


**Abbildung 4.1.4.2: Testhybridisierung zur Überprüfung der Genomkontrollen.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale aller Genomkontrollen (grün) und korrespondierender Hintergrundaktivitäten (grau) gemittelt über den gesamten Microarray. Proben von 750ng der fragmentierten genomischen DNS der vier Teststämme (MGAS315, A909, R6, UA159) wurden getrennt biotinyliert und 25 µl des Hybridisierungsgemisches auf jeweils einem Microarray hybridisiert.

Die 16S-*rRNA*-Sonde sowie die 23S-*rRNA*-Sonde zeigten als Positivkontrollen deutliche Fluoreszenzsignale, die die speziesübergreifende Funktionalität dieser Genomkontrollen bestätigte. Im Vergleich zu den *rRNA*-Sonden erzeugte die *eno*-Sonde deutlich schwächere Signale. Dies kann sowohl auf die nichtkonservierten Bereiche in der *eno*-Sondensequenz als auch auf das Vorhandensein mehrerer Genkopien der *rRNA*-Gene in den Genomen der Teststämme zurückgeführt werden.

### 4.1.4.3 Einstellung der Spiked-In Kontrollen

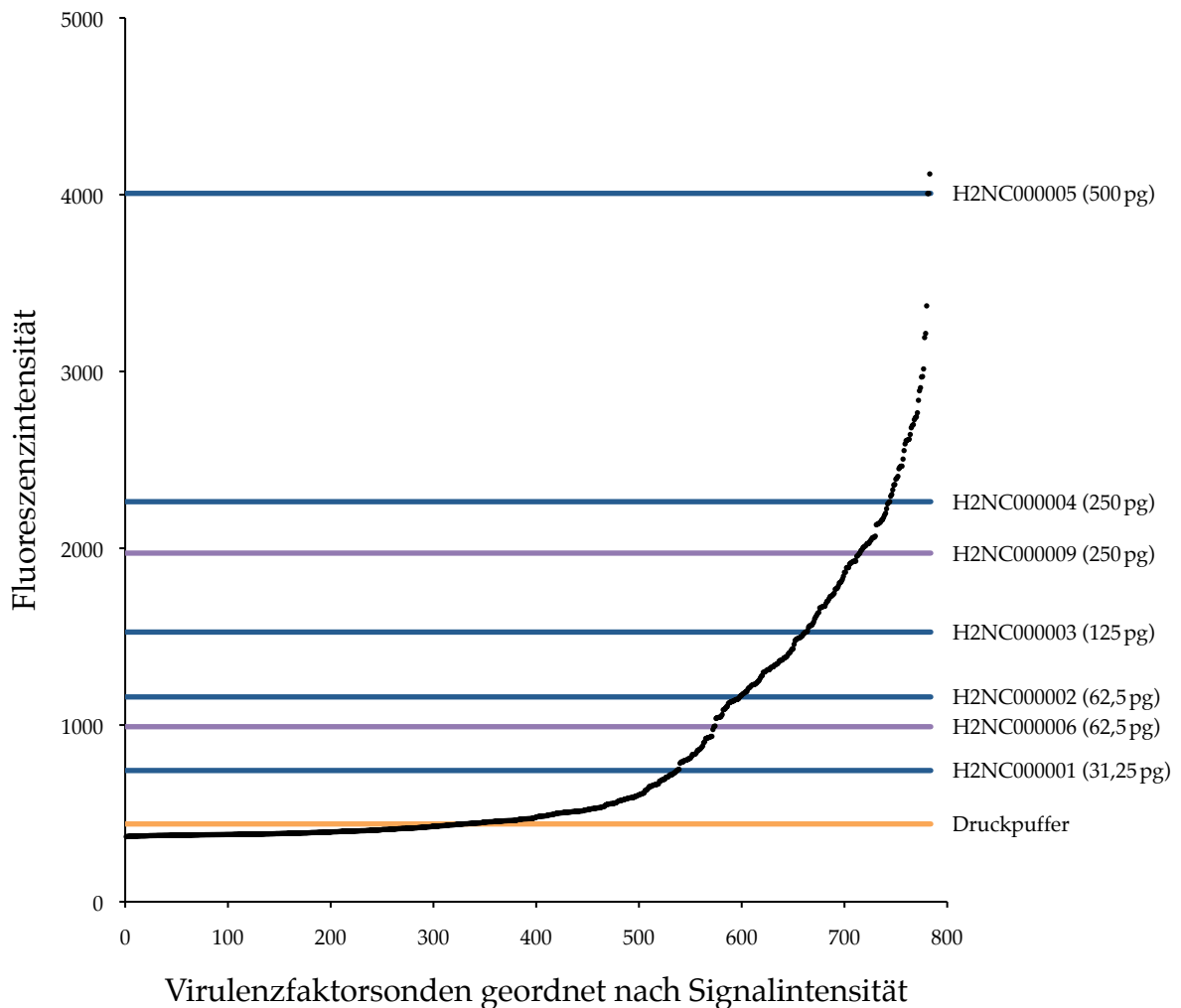
Um mögliche Einflüsse der experimentellen Durchführung auf die Vergleichbarkeit der Hybridisierungsergebnisse feststellen und ausgleichen zu können, wurden verschiedene Spiked-In Kontrollen entwickelt (4.1.2.2 und 4.1.2.3). Damit diese effizient arbeiteten, mussten die Kontrolloligonukleotide in Mengen eingesetzt werden, die in Fluoreszenzintensitäten resultieren, die gleichmäßig verteilt den gesamten Fluoreszenzintensitätsbereich der Gensonden abdeckten. Abbildung 4.1.4.3.1 zeigt die experimentell optimierten Mengen der Kontrolloligonukleotide und die daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Kontrollsonden bei einer Testhybridisierung mit dem Genom von *Streptococcus pyogenes* MGAS315.



**Abbildung 4.1.4.3.1: Optimierung der Spiked-In Kontrollen.** Eine Probe von 750 ng der fragmentierten genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315 wurde zusammen mit 62,5 pg und 250 pg der Markierungskontrolloligonukleotide biotinyliert und zusammen mit 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg sowie 500 pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben (Massenangabe in Klammern). Ein Aliquot von 25 µl des Hybridisierungsgemisches wurde auf dem Microarray hybridisiert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale aller Hybridisierungskontrollen (blau), Markierungskontrollen (violett), Druckpufferkontrollen (gelb) und korrespondierender Hintergrundaktivitäten (grau) gemittelt über den Microarray.



Ausgehend von der Druckpufferkontrolle, deren Fluoreszenzintensität nahe der Hintergrundaktivität blieb, wurde eine exponentielle Massenverteilung der Hybridisierungskontrolloligonukleotide sowie der Markierungskontrolloligonukleotide gewählt, die dementsprechend in einer exponentiellen Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollsonden resultierte. Abbildung 4.1.4.3.1 zeigt eine Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten der optimierten Spiked-In Kontrollsonden und der Fluoreszenzsignalverteilung der Gensonden einer Testhybridisierung.



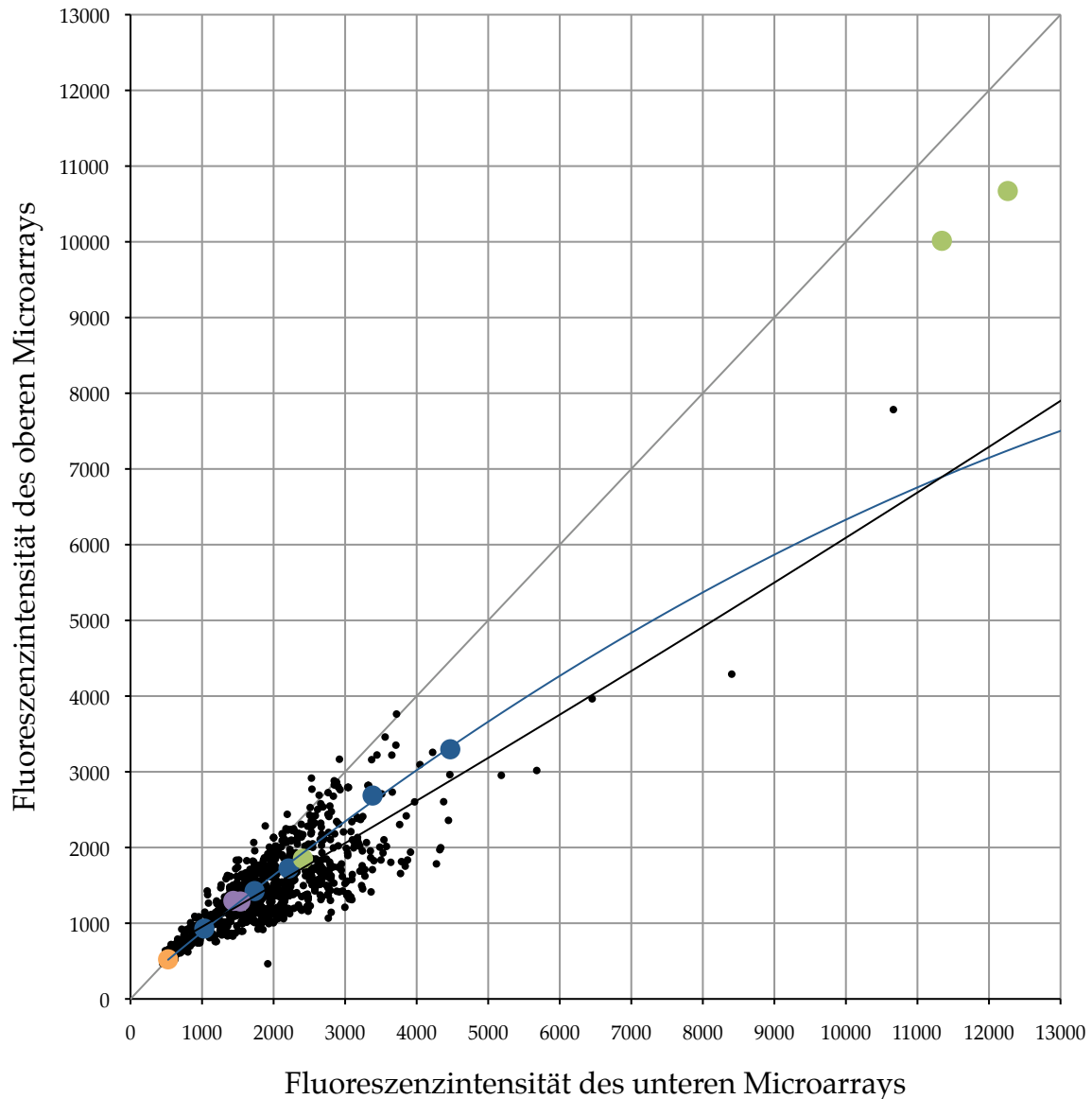
**Abbildung 4.1.4.3.2: Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten der Spiked-In Kontrollen und des Fluoreszenzintensitätsbereichs der Gensonden.** Eine Probe von 750 ng der fragmentierten genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315 wurde zusammen mit 62,5 pg und 250 pg der Markierungskontrolloligonukleotide biotinyliert und zusammen mit 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg sowie 500 pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben (Massenangabe in Klammern). Ein Aliquot von 25 µl des Hybridisierungsgemisches wurde auf dem Microarray hybridisiert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzsignale aller Gensonden geordnet nach Intensität (schwarz) sowie die Hybridisierungskontrollen (blau), Markierungskontrollen (violett) und Druckpufferkontrollen (gelb) gemittelt über den Microarray.

Der Intensitätsbereich der exponentiellen Verteilung der Fluoreszenzsignale der Gensonden nach Hybridisierung des Genoms von *Streptococcus pyogenes* MGAS315 wurde von der Kontrollenreihe aus Druckpufferkontrolle und Hybridisierungskontrollen vollständig abgedeckt. Der Einfluss der experimentellen Durchführung der Hybridisierungsreaktion auf die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten der Gensonden verschiedener Hybridisierungsexperimente konnte durch diese Verteilung für den gesamten Intensitätsbereich überwacht und mathematisch ausgeglichen werden. Die Verteilung der Fluoreszenzsignale der Markierungskontrollen innerhalb des Intensitätsbereichs der Gensonden ermöglichte die Kontrolle von Markierungseffekten für Signale niedriger Intensität (H2NC000006) und für Signale hoher Intensität (H2NC000009).

### 4.1.5 Berechnungen zur Signalintensität

Für die Auswertung der Ergebnisse des speziesübergreifenden Microarrays (4.1.2) wurden Kontrollen entwickelt, mit denen interexperimentelle Schwankungen ausgeglichen werden konnten, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einzelner Hybridisierungsexperimente herzustellen (4.1.2.2 und 4.1.2.3). Außerdem wurden Kontrollen benötigt, mit deren Hilfe Schwellenwerte berechnet werden konnten, die die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen ermöglichten (4.1.2.4).

Anhand der integrierten Spiked-In Kontrollen (4.1.2.2 und 4.1.2.3) wurden Ursachen interexperimenteller Variabilität in den Signalintensitäten gesucht. Vergleichende Testhybridisierungen, durchgeführt mit einem Gemisch der genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159, sollten Einflüsse des experimentellen Ablaufs anhand der integrierten Kontrollen erkennen lassen. Abbildung 4.1.5.1 zeigt die Fluoreszenzintensitäten der Testhybridisierung auf zwei Microarrays eines Slides in einer Gegenüberstellung.



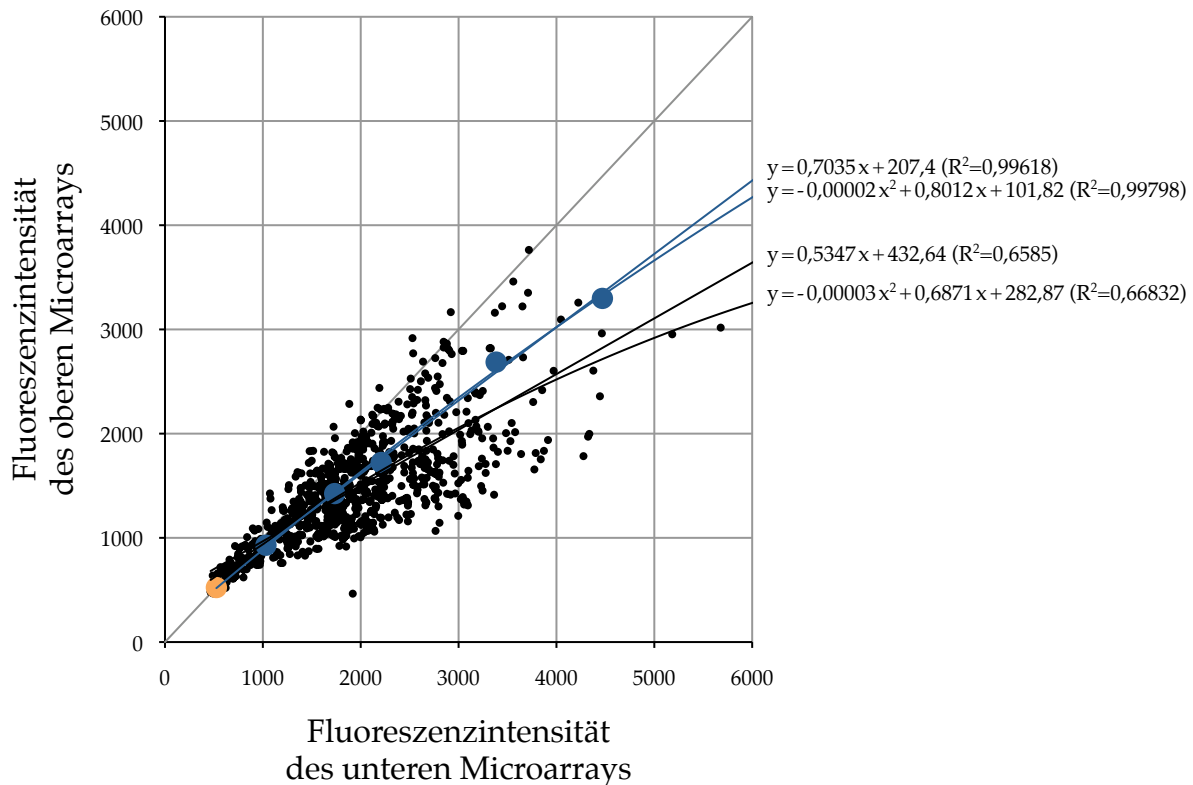
**Abbildung 4.1.5: Vergleich der Fluoreszenzsignale von zwei Microarrays.** Ein Gemisch aus jeweils 750ng der fragmentierten genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 wurde zusammen mit 62,5pg und 250pg der Markierungskontrolloligonukleotide biotinyliert und zusammen mit 31,25pg, 62,5pg, 125pg, 250pg sowie 500pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Ein Aliquot von jeweils 25  $\mu$ l des Hybridisierungsgemisches wurde getrennt auf beiden Microarrays eines Slides hybridisiert. Gegenübergestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzsignale aller Gensonden (schwarze Punkte) sowie der Hybridisierungskontrollen (blaue Punkte), Markierungskontrollen (violette Punkte), Genomkontrollen (grüne Punkte) und Druckpufferkontrollen (gelber Punkt) gemittelt über den Microarray. Zur Veranschaulichung der Abweichung der Hybridisierungsergebnisse der beiden Microarrays voneinander wurden Polynome zweiten Grades als Trendlinien mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate errechnet und eingefügt. Die Polynome zeigen die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Gensonden (schwarze Linie) sowie die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und der Druckpufferkontrolle (blaue Linie) von der Diagonalen. Die Diagonale repräsentiert den Idealfall, in dem gleiche Sonden in beiden Microarrays gleiche Fluoreszenzintensitäten zeigen.

Eine Abweichung der Fluoreszenzsignale von der Diagonalen zeigte, dass sowohl Gensonden als auch Kontrollsonden auf dem unteren Microarray deutlich stärkere Fluoreszenzsignale erzeugten als auf dem oberen Microarray. Die Signale der Genomkontrollen, der Markierungskontrollen und der Hybridisierungskontrollen wichen in gleichem Maße von der Diagonalen ab, sodass sie eine gemeinsame Linie beschrieben (blaue Linie). Daher konnte sowohl die Genompräparation als auch die Markierungsreaktion als Ursache für die Abweichung ausgeschlossen werden. Der beobachtete experimentelle Einfluss konnte folglich nur während der Hybridisierungsreaktion entstanden sein und musste über die Hybridisierungskontrollen mathematisch ausgeglichen werden. Dazu wurde eine signalabhängige, nichtlineare Normalisierungsmethode entwickelt (4.1.5.1).

Für die Untersuchung der Genverteilung in verschiedenen Streptokokkenisolaten war eine Umformung der Fluoreszenzsignale in eindeutige Präsenz-Absenz-Aussagen nötig. Mit Hilfe der Spezifitätskontrollen (4.1.2.4) wurden Schwellenwerte ermittelt, die für jede Gensonde die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Fluoreszenzsignalen ermöglichte. Dafür wurde eine signalabhängige pinarraybezogene Schwellenwertberechnung entwickelt (4.1.5.2).

### 4.1.5.1 Signalnormalisierung

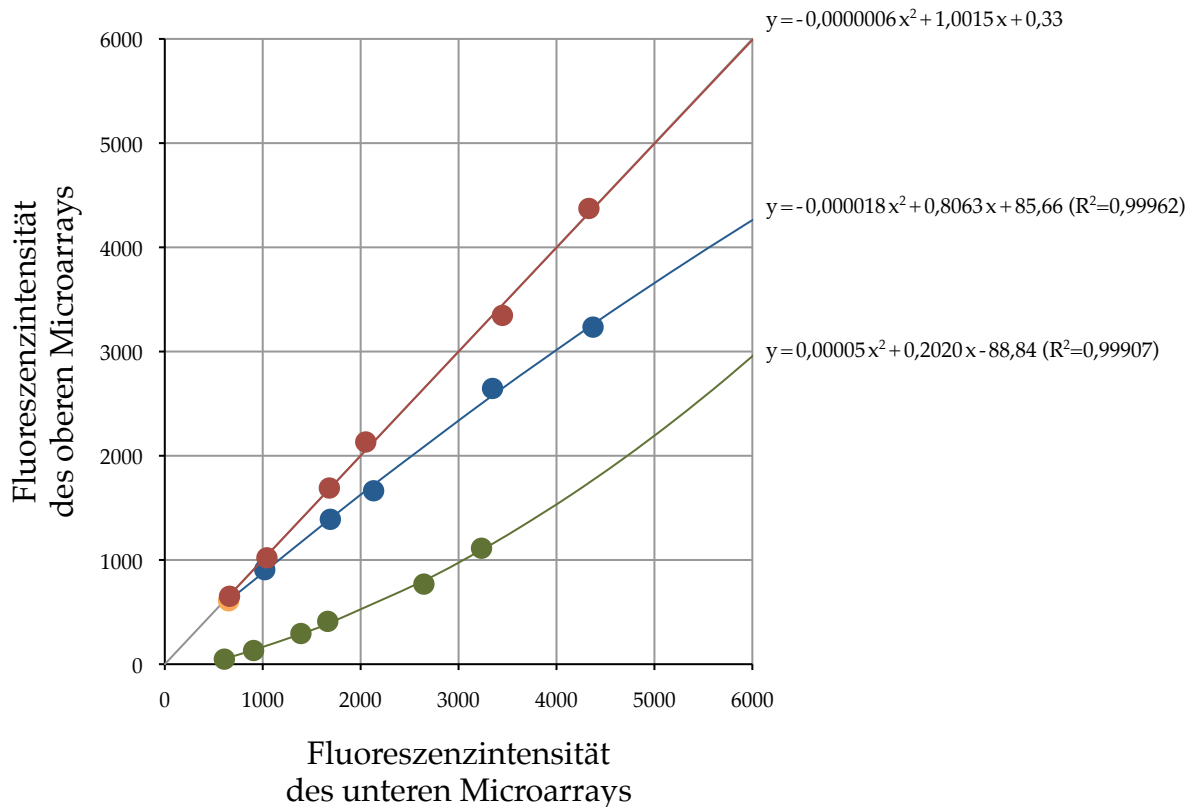
Die experimentell bedingte Variabilität der Hybridisierungsergebnisse (Abbildung 4.1.5.1) konnte durch Standardisierung des experimentellen Ablaufs nicht weiter reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Microarrayanalysen musste deshalb auf mathematischem Wege ermöglicht werden. Abbildung 4.1.5.1.1 zeigt eine Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse eines Gemisches der genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159 hybridisiert auf zwei Microarrays eines Slides. Es sollte ein mathematisches Modell ermittelt werden, das die experimentell bedingten Abweichungen in den Hybridisierungsergebnissen beschreiben und ausgleichen kann.



**Abbildung 4.1.5.1.1: Beschreibung der interexperimentellen Abweichungen.** Ein Gemisch aus jeweils 750 ng der fragmentierten genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 wurde biotinyliert und zusammen mit 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg sowie 500 pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Ein Aliquot von jeweils 25  $\mu$ l des Hybridisierungsgemisches wurde getrennt auf den beiden Microarrays eines Slides hybridisiert. Gegenübergestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzsignale aller Gensonden (schwarze Punkte) sowie der Hybridisierungskontrollen (blaue Punkte) und Druckpufferkontrolle (gelber Punkt) gemittelt über den Microarray. Zur Veranschaulichung der Abweichung zwischen den Hybridisierungsergebnissen der beiden Microarrays wurden Geraden sowie Polynome zweiter Ordnung als Trendlinien mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet und eingefügt. Die Trendlinien zeigen die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Gensonden (schwarze Linien) sowie die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle (blaue Linien) von der Diagonalen. Die Diagonale repräsentiert den Idealfall, in dem gleiche Sonden in beiden Microarrays gleiche Fluoreszenzintensitäten zeigen. Für jede Trendlinie ist rechts die mathematische Funktion sowie das Bestimmtheitsmaß der Regression (in Klammern) angegeben.

Die Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten der Gen- und Kontrollsonden zeigte eine Verlagerung der Signale in den Bereich rechts von der Diagonalen. Dieser Effekt war bei niedriger Signalintensität sehr gering und steigerte sich mit zunehmender Signalstärke. Die Verlagerung, die die interexperimentelle Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der beiden Microarrays voneinander beschreibt, wurde durch verschiedene Trendlinien verdeutlicht. Die Tatsache, dass die Regressionen der Trendlinienpolynome sowohl für die Gensonden als auch für die Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle ein

höheres Bestimmtheitsmaß aufwiesen als die Regressionen der linearen Trendlinien, zeigte an, dass sich die experimentellen Einflüsse mit zunehmender Signalintensität nicht linear auswirkten. Zum Ausgleich dieser Effekte musste folglich ein nichtlineares Modell angewendet werden. Abbildung 4.1.5.1.2 verdeutlicht die Normalisierung am Beispiel der Fluoreszenzsignale der Hybridisierungskontrollen sowie der Druckpufferkontrolle der bereits beschriebenen Testhybridisierung (Abbildung 4.1.5.1.1).



**Abbildung 4.1.5.1.2: Normalisierung der Fluoreszenzsignale der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollsonden und Druckpufferkontrolle.** Ein Gemisch aus jeweils 750 ng der fragmentierten genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 wurde biotinyliert und zusammen mit 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg sowie 500 pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Ein Aliquot von jeweils 25 µl des Hybridisierungsgemisches wurde getrennt auf den beiden Microarrays eines Slides hybridisiert. Gegenübergestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzsignale der Hybridisierungskontrollen (blaue Punkte) und Druckpufferkontrollen (gelber Punkt) gemittelt über den Microarray. Zur Veranschaulichung der Abweichung der Hybridisierungsergebnisse der beiden Microarrays voneinander wurde ein Polynom zweiten Grades als Trendlinie mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet und eingefügt (blaue Linie). Die Differenz der Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierungskontrollen sowie der Druckpufferkontrolle des oberen Microarrays von den korrespondierenden Werten des unteren Microarrays wurde in Abhängigkeit von den Fluoreszenzintensitäten des oberen Arrays dargestellt (grüne Punkte). Die berechnete Trendlinie durch diese Punkte (grüne Linie) ermöglichte die Normalisierung der Fluoreszenzsignale der Kontrollsonden (blaue Punkte), sodass diese auf der Diagonalen zu liegen kommen (rote Punkte). Das Polynom als Trendlinie der normalisierten Fluoreszenzsignale der Kontrollsonden (rote Linie) legt sich dementsprechend der Diagonalen an. Für alle drei Trendlinien ist rechts die Funktion sowie das Bestimmtheitsmaß der Regression (in Klammern) angegeben.

## 4 Ergebnisse

---

Die Gegenüberstellung zeigt die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierungskontrollen (blaue Punkte) sowie der Druckpufferkontrollen (gelber Punkt) der beiden Microarrayhybridisierungen voneinander. Ein Polynom zweiten Grades wurde mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate als Trendlinie der sechs Punkte berechnet (blaue Linie). Die Funktion dieses Polynoms drückt die Abweichung der Signalintensitäten des oberen Microarrays (y) von den Signalintensitäten des unteren Microarrays (x) aus.

$$y = -0,000018x^2 + 0,8063x + 85,66$$

x = Signalintensität des unteren Microarrays  
y = Signalintensität des oberen Microarrays

Anhand dieser Funktion konnten die mit den Kontrollpunkten (blaue Punkte und gelber Punkt) korrespondierenden Abweichpunkte (grüne Punkte) berechnet werden. Diese stellten für jeden Kontrollpunkt die Differenz aus der Signalintensität des oberen und unteren Microarrays (y) in Abhängigkeit von der Signalintensität des unteren Microarrays (x) dar. Diese Abhängigkeit wurde als Polynom zweiten Grades durch sechs Abweichpunkte ausgedrückt. (grüne Linie).

$$y = 0,00005x^2 + 0,2020x - 88,84$$

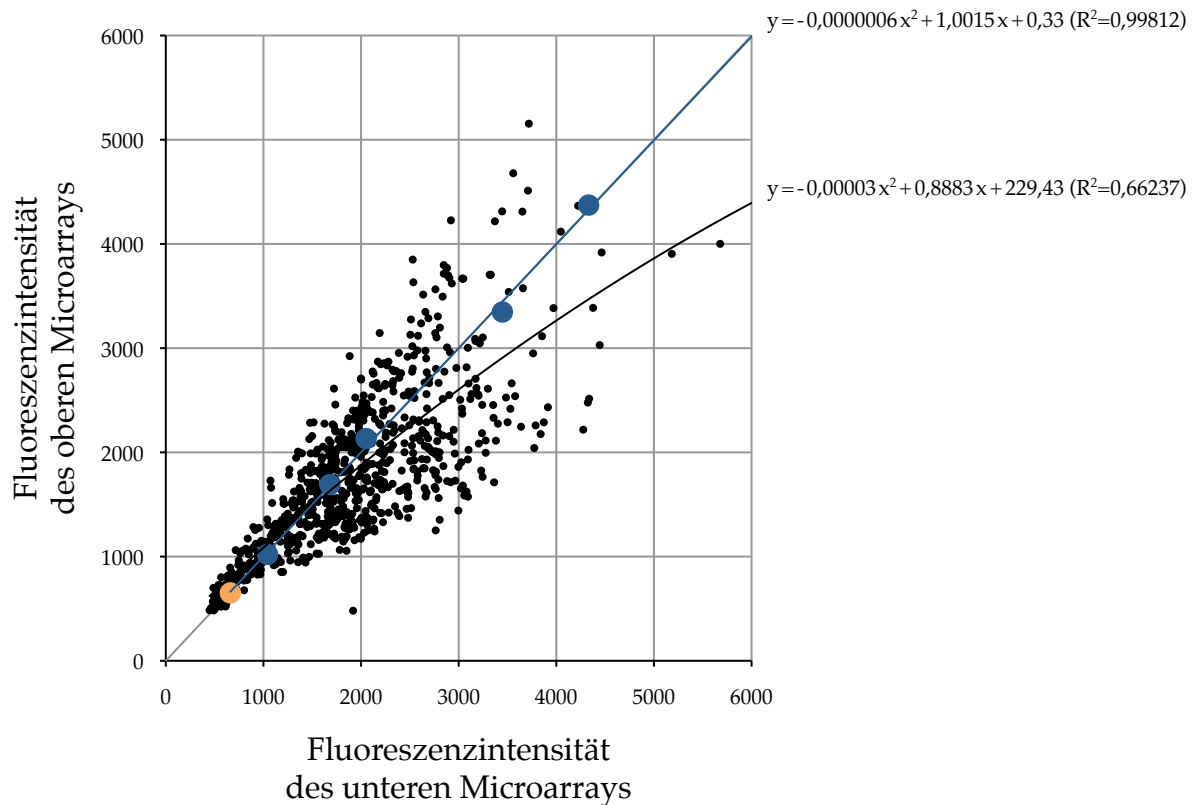
x = Signalintensität des oberen Microarrays  
y = Differenz der Signalintensität des oberen Microarrays vom unteren Microarrays

Die Funktion dieser Abweichkurve beschreibt die Differenz zwischen den Fluoreszenzintensitäten des oberen und unteren Microarrays. Folglich konnte durch Addition eine signalabhängige Normalisierung der abweichenden Werte (blaue Punkte und gelber Punkt) durchgeführt werden. Wie Abbildung 4.1.5.1.2 zeigt, kommen die normalisierten Werte der Kontrollpunkte auf der Diagonalen zu liegen (rote Punkte).

$$y = (0,00005x^2 + 0,2020x - 88,84) + x$$

x = Signalintensität des oberen Microarrays  
y = normalisierte Signalintensität des oberen Microarrays

Anhand dieser Methode war es möglich, für jedes Hybridisierungsexperiment eine Korrekturformel zu berechnen, die die Abweichung eines Signals in Abhängigkeit von seiner Fluoreszenzintensität ausgleicht. Abbildung 4.1.5.1.3 verdeutlicht die Auswirkungen der Normalisierung auf die Fluoreszenzsignale der Gensonden.



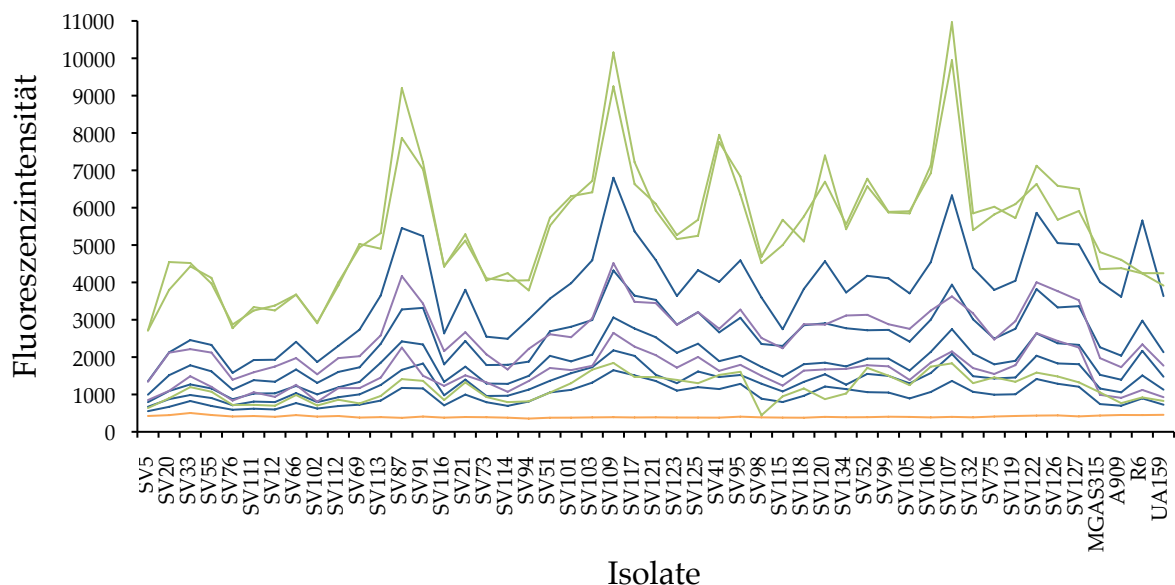
**Abbildung 4.1.5.1.3: Auswirkung der Normalisierung auf die Signale der Gensonden.** Ein Gemisch aus jeweils 750 ng der fragmentierten genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 wurde biotinyliert und zusammen mit 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg sowie 500 pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Ein Aliquot von jeweils 25  $\mu$ l des Hybridisierungsgemisches wurde getrennt auf den beiden Microarrays eines Slides hybridisiert. Gegenübergestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller Gensonden (schwarze Punkte) sowie der Hybridisierungskontrollen (blaue Punkte) und Druckpufferkontrollen (gelber Punkt) nach signalabhängiger, nichtlinearer Normalisierung anhand der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle. Zur Veranschaulichung der Reduktion der Abweichungen zwischen den Hybridisierungsergebnissen der beiden Microarrays nach erfolgter Normalisierung (Vergleich Abbildung 4.1.5.1.1) wurden Polynome zweiten Grades als Trendlinien mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet und eingefügt. Die Trendlinien zeigen die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Gensonden (schwarze Linie) sowie die Abweichung der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle (blaue Linie) von der Diagonalen. Die Diagonale repräsentiert den Idealfall, in dem gleiche Sonden in beiden Microarrays gleiche Fluoreszenzintensitäten zeigen. Jeder Trendlinie ist rechts die mathematische Formel sowie das Bestimmtheitsmaß der Regression (in Klammern) zugeordnet.

Der Vergleich der Signalverteilung in Abbildung 4.1.5.1.3 mit der Verteilung vor der Normalisierung in Abbildung 4.1.5.1.1 zeigte deutlich den Effekt der Normalisierung auf die Daten. Die normalisierten Fluoreszenzsignale der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle lagen im Vergleich zu den nicht normalisierten Werten nahe der Diagonalen, die Formel der eingefügten Trendlinie ( $y = -0,0000006x^2 + 1,0015x + 0,33$ ) näherte sich der Diagonalen ( $x = y$ ) an. Die Signale der Gensonden verteilten sich nach der Normalisierung deutlich



gleichmäßiger zu beiden Seiten der Diagonalen. Die Trendlinie der Signalverteilung der Gensonden zeigte eine stark verminderte, aber noch immer vorhandene Abweichung. Diese Abweichung zwischen der Verteilung der Gensonden und der Verteilung der Kontrollen, auf denen die Normalisierung beruhte, konnte auf diesem Wege nicht ausgeglichen werden und wurde vernachlässigt.

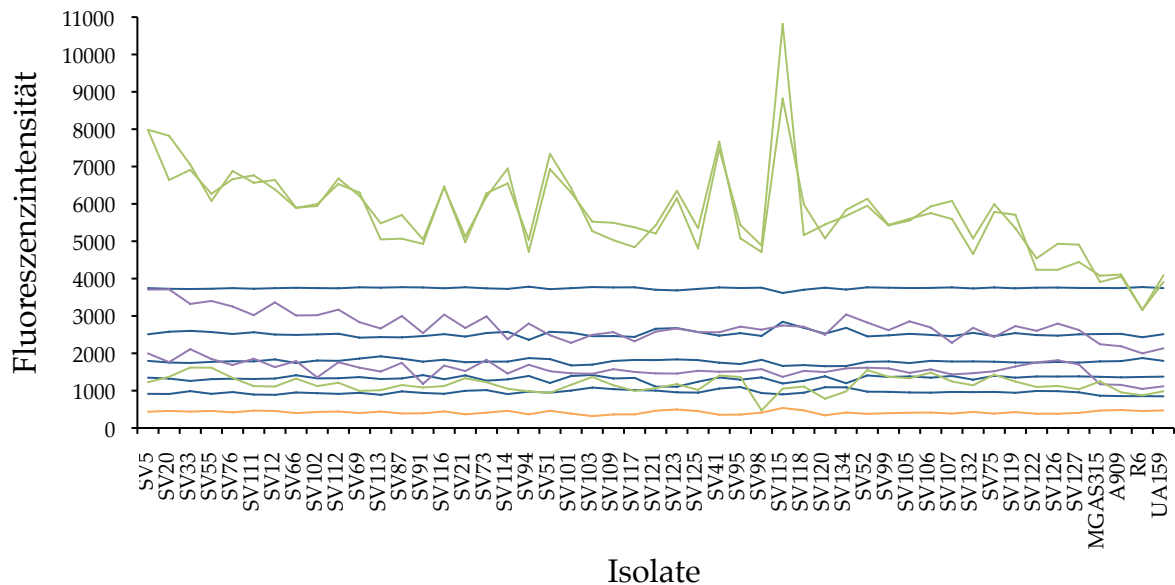
Wie oben beschrieben, wurden zur Veranschaulichung der Auswirkungen der entwickelten Normalisierung die Signalintensitäten des oberen Microarrays anhand der Signale des unteren Microarrays korrigiert. Die Normalisierung umfangreicherer Datensätze (4.2.1) bezog sich hingegen auf den arithmetischen Mittelwert der einzelnen Kontrollpunkte gemittelt über den gesamten Datensatz aus 49 Hybridisierungsexperimenten. Abbildung 4.1.5.1.4 und 4.1.5.1.5 verdeutlichen den Einfluss der Normalisierung auf einen Datensatz aus 49 hybridisierten Isolaten (4.2.1).



**Abbildung 4.1.5.1.4: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollsonden aus 49 Hybridisierungsexperimenten.** Jeweils 750ng der fragmentierten genomischen DNS von 49 Streptokokkenisolaten wurden zusammen mit 62,5pg und 250pg der Markierungskontrolloligonukleotide biotinyliert und zusammen mit 31,25pg, 62,5pg, 125pg, 250pg sowie 500pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Ein Aliquot von jeweils 25µl des Hybridisierungsgemisches wurde auf einem Microarray hybridisiert. Die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller Genomkontrollen (*grüne Linien*), Markierungskontrollen (*violette Linien*), Hybridisierungskontrollen (*blaue Linien*) sowie Druckpufferkontrollen (*gelbe Linie*) sind vergleichend für alle 49 Hybridisierungen dargestellt.

Die Fluoreszenzsignale der Kontrollsonden der einzelnen Hybridisierungen zeigten vor der Normalisierung deutliche Abweichungen voneinander. Die Ursache dieser Variationen waren, wie bereits gezeigt (Abbildung 4.1.5.1), interexperimentelle Abweichungen zwischen den Hybridisierungsreaktionen. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch das Signalverhalten der Genomkontrollen und der Markierungs-

kontrollen, die den wellenförmigen Signalvariationen der Hybridisierungskontrollen folgten.



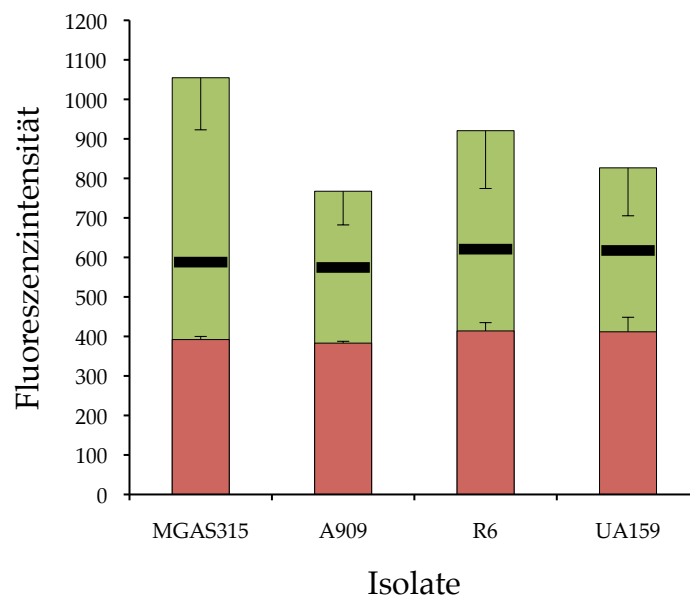
**Abbildung 4.1.5.1.5: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollsonden aus 49 Hybridisierungsexperimenten nach Normalisierung.** Jeweils 750 ng der fragmentierten genomischen DNS von 49 Streptokokkenisolaten wurden zusammen mit 62,5 pg und 250 pg der Markierungskontrolloligonukleotide biotinyliert und zusammen mit 31,25 pg, 62,5 pg, 125 pg, 250 pg sowie 500 pg der Hybridisierungskontrolloligonukleotide in das Hybridisierungsgemisch gegeben. Ein Aliquot von jeweils 25  $\mu$ l des Hybridisierungsgemisches wurde auf einem Microarray hybridisiert. Die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller Genomkontrollen (*grüne Linien*), Markierungskontrollen (*violette Linien*), Hybridisierungskontrollen (*blaue Linien*) sowie Druckpufferkontrollen (*gelbe Linie*) wurden anhand der Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle normalisiert und sind vergleichend für alle 49 Hybridisierungen dargestellt.

Nach der Normalisierung des Datensatzes zeigte das Signalverhalten der Kontrollen der verschiedenen Hybridisierungsexperimente deutlich weniger Abweichungen voneinander. Die Hybridisierungskontrollen sowie die Druckpufferkontrolle, auf denen die Normalisierungsberechnung beruhte, zeigten nur noch geringe Abweichungen zwischen den einzelnen Hybridisierungen. Die Abweichungen der Genomkontrollen sowie der Markierungskontrollen zwischen den einzelnen Microarrayhybridisierungen wurden durch die Normalisierung deutlich reduziert. Die Vergleichbarkeit der Hybridisierungsexperimente des analysierten Datensatzes (4.2.1) war nach der Normalisierung ausreichend für weiterführende Betrachtungen (4.2.2).

### 4.1.5.2 Schwellenwertberechnung

Die Anwendung des speziesübergreifenden Microarrays zur Untersuchung der genetischen Ausstattung einzelner Streptokokkenisolate sollte einen Einblick in genetische Ähnlichkeiten und den genetischen Austausch innerhalb der Gattung

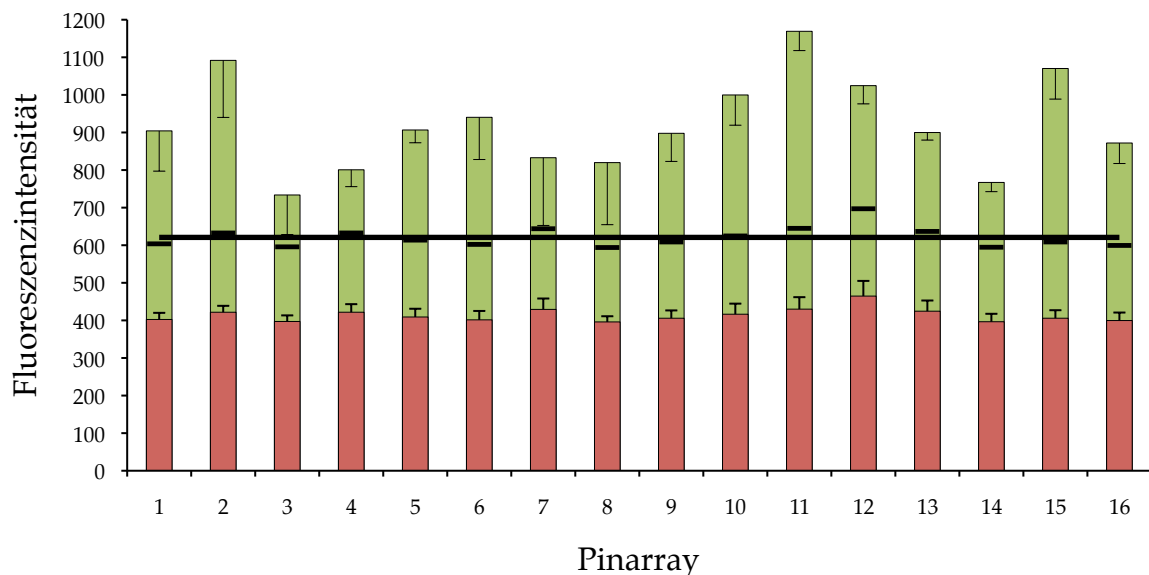
*Streptococcus* ermöglichen. Dafür wurden anhand der Spezifitätskontrollen Schwellenwerte berechnet, die es ermöglichten, für jede Gensonde zwischen spezifischen und unspezifischen Fluoreszenzsignalen zu unterscheiden, um eindeutige Präsenz-Absenz-Aussagen (binäre Aussage) treffen zu können. Da sowohl das *16S-rRNA*-Gen als auch das *23S-rRNA*-Gen bei Streptokokken in mehreren Kopien im Genom vorhanden ist, waren die Signalintensitäten dieser Genomkontrollen für die Optimierung der Schwellenwertberechnung ungeeignet. Die Signalintensitäten der *eno*-Sonde, deren korrespondierendes Gen im Genom der vier Teststämme (MGAS315, A909, R6, UA159) nur jeweils einmal vorkommt und teilweise Sequenzfehlpaarungen aufweist (Abbildung 4.1.2.1.2), wurde als Referenz für das Signalverhalten der Gensonden bei der Berechnung des optimalen Schwellenwertes eingesetzt. Daher musste eine Schwellenwertberechnung entwickelt werden, die auf den Signalintensitäten der Spezifitätskontrollen beruht und die Signale der *eno*-Sonden als im Genom vorhanden klassifiziert. Um dies weiter sicherzustellen, dass ausschließlich Gensonden signifikant starker Signalintensität als positiv gewertet wurden, wurden die arithmetischen Mittelwerte der vier Replikate jeder Gensonde um die korrespondierende Standardabweichung reduziert. Abbildung 4.1.5.2.1 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten der *eno*-Sonde, der Spezifitätskontrollen sowie der berechneten Schwellenwerte für die hybridisierte genomische DNS der vier Teststämme (MGAS315, A909, R6, UA159) für den gesamten Microarray.



**Abbildung 4.1.5.2.1: Ermittlung des Schwellenwertes.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die korrespondierenden Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten der *eno*-Sonde (grün) und der Spezifitätskontrollen (rot) der Hybridisierung der genomischen DNS von *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 gemittelt über den gesamten Microarray. Als Schwellenwert (schwarzer Balken) wurden 150% des arithmetischen Mittelwertes der Spezifitätskontrollen festgelegt.

Ein Schwellenwert von 150% des arithmetischen Mittelwertes der Spezifitätskontrollen erwies sich als geeignet. Selbst nach Abzug der Standardabweichung waren die Signale der *eno*-Sonden deutlich oberhalb der berechneten Schwellenwerte. Zudem befanden sich die Schwellenwerte in ausreichendem Abstand zum Signalvarianzbereich der Spezifitätskontrollen, was Falschwertungen durch Schwankungen der Signalintensität der Kontrollsonden vorbeugte.

Vorversuche hatten gezeigt, dass es innerhalb des Microarrays zu experimentell bedingten Gradienten in der Signalintensität kommen kann (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde für jeden Pinarray ein Schwellenwert berechnet und die Umformung der Daten in Binärwerte separat durchgeführt. Abbildung 4.1.5.2.2 verdeutlicht die Intensitätsschwankungen der Spezifitätskontrollen der einzelnen Pinarrays und die daraus resultierenden Schwellenwerte der Microarray-hybridisierung des Genoms von *Streptococcus pneumoniae* R6.



**Abbildung 4.1.5.2.2: Pinarraybasierte Schwellenwertberechnung.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die korrespondierenden Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten der *eno*-Sonde (grün) und der Spezifitätskontrollen (rot) für jeden Pinarray der Genomhybridisierung von *Streptococcus pneumoniae* R6. Als Schwellenwerte (schwarze Balken) wurden 150% des arithmetischen Mittelwertes der Spezifitätskontrollen des jeweiligen Pinarrays eingesetzt. Zum Vergleich wurde der Schwellenwert berechnet über den gesamten Microarray (schwarze Linie) eingefügt.

Die Varianzen in den Spezifitätskontrollsignalen zwischen den einzelnen Pinarrays resultierte in deutlich unterschiedlichen Schwellenwerten. Dennoch wertete auch die separate Schwellenwertberechnung für jeden Pinarray das *eno*-Gen als vorhanden. Der Unterschied zwischen einzelnen Pinarrayschwellenwerten (schwarze Balken) und dem Schwellenwert berechnet für den gesamten Microarray (schwarze Linie) zeigte, dass sich die pinarrayseparierte Schwellenwertberechnung Intensitätsschwankungen besser anpassen konnte. Die Gefahr falscher Wertungen wurde dadurch weiter reduziert.

## 4.2 Microarrayanalysen klinischer Isolate

Ziel dieser Arbeit war es, den speziesübergreifenden Virulenzfaktormicroarray einzusetzen, um einen Einblick in die Pathogenität innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken zu erhalten. Dazu wurde eine Auswahl klinischer Isolate mit Hilfe des entwickelten Microarraysystems analysiert (4.2.1), um anhand von Vorkommen und Verteilung virulenzrelevanter Gene mögliche Ursachen für die Pathogenität der Oralstreptokokken aufzuklären (4.2.3). Zudem wurde mit Hilfe der Microarrayanalysen eine eindeutige Spezieszuordnung der ausgewählten Isolate gewährleistet (4.2.2.1). Dies sollte nicht nur der Bewertung des entwickelten Microarraysystems als Speziestypisierungsmethode dienen, sondern auch Einblicke in die phylogenetischen Beziehungen zwischen den analysierten Isolaten ermöglichen (4.2.2.2). Die Identifizierung gruppen- und speziesspezifischer Gensonden stellt zudem eine Vorarbeit zur Entwicklung eines diagnostischen Microarraysystems und anderer hybridisierungsbasierter Diagnosemethoden (fluorescence *in situ* hybridization, PCR) dar (4.2.4).

### 4.2.1 Auswahl und Analyse klinischer Oralstreptokokkenisolate

Aus einer Sammlung klinischer Isolate, erstellt vom Institut für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie des Universitätsklinikums Leipzig (3.2.1), wurden 45 Isolate für die Microarrayanalysen ausgewählt. Da der Beitrag einzelner Spezies zur Pathogenese multibakterieller Infektionen schwer zu analysieren ist, wurden bei der Auswahl Isolate aus Monoinfektionen bevorzugt. Um eine eindeutige Spezieszuordnung der ausgewählten Isolate zu gewährleisten, wurden die Speziestypisierungen der biochemischen Analytik des API® 20 Strep Systems und der PCR-Tests durch 16S-rRNA-Gensequenzanalysen erweitert. Dazu wurden definierte Bereiche des 16S-rRNA-Gens aller ausgewählten Streptokokkenisolate aus der genomischen DNS (3.4.1.1) amplifiziert (3.4.1.4), aufgereinigt (3.4.1.2) und sequenziert (3.4.1.5). Durch einen Datenbankvergleich der amplifizierten 16S-rRNA-Gensequenzen (3.5.2) lagen somit die Ergebnisse einer dritten Speziestypisierungsmethode vor.

Anhand der durchgeführten Typisierungen konnten die ausgewählten Isolate in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Tabelle 4.2.1 zeigt alle Isolate, die durch die PCR-Tests und die 16S-rRNA-Gensequenzanalysen eindeutig einer Spezies zugeordnet werden konnten. Um die Anwendbarkeit des entwickelten Microarraysystems als Methode zur Speziestypisierung zu überprüfen, wurden auch Isolate untersucht, bei denen die biochemischen Analysen, PCR-Tests und 16S-rRNA-Gensequenzanalysen keine übereinstimmende Spezieszuordnung lieferten. Diese Isolate sind in Tabelle 4.2.2 aufgeführt.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4.2.1.1: Auswahl klinischer Oralstreptokokkenisolate für die Microarrayanalysen.**

Bezeichnung	16S-rRNA-Typisierung**	PCR-Typisierung**	API 20 Strep-Typisierung**	Isolation
SV111*	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Ohrabstrich
SV112*	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabstrich
SV113*	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabstrich
SV114	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Zahnleistenpunktat
SV115	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur
SV5	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur
SV12	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabszess
SV116	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur
SV117	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur
SV55	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur
SV118	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	Abszessmaterial
SV119	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	Blutkultur
SV20	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Wundabszess
SV121	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Blutkultur
SV122	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Wangenabszess
SV123	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Blutkultur
SV125	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial
SV126	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abszessmaterial
SV127	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabstrich
SV132	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Drainagespitze
SV134	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur
SV33	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Pleurapunktat
SV52*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Abszessmaterial
SV66	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur
SV75	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Fistelabstrich
SV91	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus equi</i>	Punktat
SV21	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial
SV94*	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial
SV95	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abstrich
SV99	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial
SV102	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Ohrmuschelabszess
SV101	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	Blutkultur
SV103	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur
SV105	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Blutkultur
SV106	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur
SV41*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abstrich
SV69*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	Blutkultur
SV87*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Abstrich
SV107*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	Blutkultur
SV109	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur

\* Die gekennzeichneten Isolate wurden zusammen mit anderen Bakterienarten isoliert und stellen somit keine Isolate aus Monoinfektionen dar.

\*\* Die Farbgebung der Speziestypisierungsergebnisse teilt die Isolate nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* ein. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau) sowie pyogene Gruppe (rot).

**Tabelle 4.2.1.2: Schwer typisierbare Isolate innerhalb der Auswahl.**

Bezeichnung	16S-rRNA-Typisierung**	PCR-Typisierung**	API 20 Strep-Typisierung**	Isolation
SV51	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial
SV73*	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabstrich
SV120	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur
SV76	<i>Streptococcus australis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur
SV98	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Blutkultur

\* Das gekennzeichnete Isolat wurde zusammen mit anderen Bakterienarten isoliert und stellt somit kein Isolat aus einer Monoinfektion dar.

\*\* Die Farbgebung der Speziestypisierungsergebnisse unterteilt die Isolate nach Streptokokken der Mitisgruppe (gelb) und Spezies, die nicht zur Gattung *Streptococcus* gehören (schwarz).

Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich zu den 45 klinischen Isolaten die vier Teststämme *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 sowie *Streptococcus mutans* UA159 (3.2.2) für die Microarrayanalysen herangezogen.

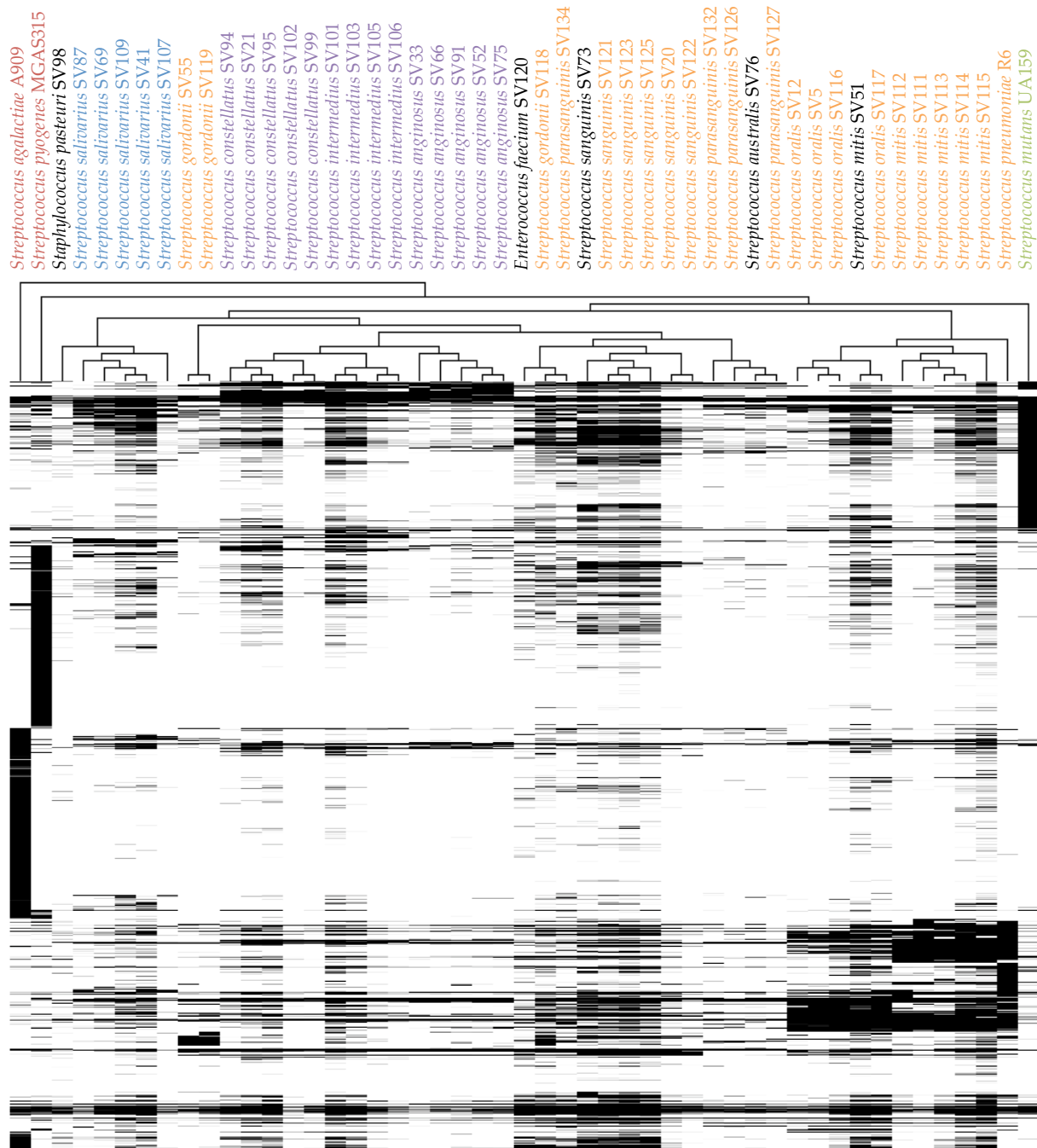
### 4.2.2 Clusteranalysen der Microarraysignale

Die Hybridisierungsergebnisse der 49 Isolate wurden vergleichenden Clusteranalysen unterzogen, um die Anwendbarkeit des entwickelten Microarraysystems als Speziestypisierungsmethode zu untersuchen (4.2.2.1). Die phylogenetischen Beziehungen zwischen den analysierten Isolaten, die sich aus der Clusteranalyse der Microarraysignale ergaben, wurden einer vergleichenden 16S-rRNA-Gensequenzanalyse gegenübergestellt (4.2.2.2).

#### 4.2.2.1 Speziestypisierung mit Hilfe hierarchischer Clusteranalysen

Die hierarchische Clusteranalyse basierend auf den Microarraysignalen vergleicht die 49 Isolate anhand der normalisierten Signalintensitäten aller 776 Gensonden des Microarrays mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus und setzt sie in hierarchisch dichotome Beziehung zueinander (3.5.3.2). Diese wurde in Baumform dargestellt. Die Verwendung normalisierter Signalintensitäten (3.5.3.2) ermöglichte im Gegensatz zu den erzeugten Binärdaten (3.5.3.3) Clusteranalysen deutlich höherer Spezifität (Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.2.2.1 zeigt die vergleichende Clusteranalyse aller 49 hybridisierten Bakterienisolate.





**Abbildung 4.2.2.1: Clusteranalyse von 49 klinischen Bakterienisolaten.** Dargestellt ist eine zweidimensionale Clusteranalyse, bei der die 49 Bakterienisolate basierend auf den normalisierten Signalintensitäten aller 776 Gensonden mit Hilfe der Average-Linkage Pearson-Korrelation verglichen wurden. Die Signalintensitäten der Gensonden wurden als Graustufen dargestellt. Der Schwarzanteil nimmt mit steigender Signalstärke zu. Die hierarchisch dichotomen Beziehungen der Isolate sind oben in Baumform dargestellt (1. Dimension). Die korrespondierende Baumdarstellung der Einteilung der Gensonden ist nicht abgebildet (2. Dimension). Spezies und Stammsammlungsnummer der Isolate sind oberhalb der Baumdarstellung angegeben. Für die fünf nicht eindeutig typisierbaren Isolate wurde die Spezieszuordnung der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse angegeben (schwarz). Die Farbgebung der Beschriftungen teilt die eindeutig typisierbaren Isolate nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* ein. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot).



Trotz der geringen Anzahl deutlich positiver Signale, die vor allem bei Genen aus den Streptokokkenarten der pyogenen Gruppe *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus agalactiae* zu beobachten war, war die Clusteranalyse in der Lage, anhand der normalisierten Signalintensitäten aller 776 Gensonden einen Großteil der analysierten Isolate entsprechend ihrer Spezies in distinkte Gruppen einzuteilen. Die Ergebnisse dieser Speziestypisierung der eindeutig typisierbaren Isolate der Arten *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* und *Streptococcus salivarius* entsprachen den Ergebnissen der PCR-Tests und der 16S-rRNA-Gensequenzanalysen. Dies verdeutlicht die Funktionalität des entwickelten Microarraysystems und der angewandten Normalisierungsmethode und zeigt, dass eine Speziestypisierung anhand der Hybridisierungsergebnisse von 776 Genen eine Alternative oder Ergänzung zu bestehenden Typisierungsmethoden darstellt.

Die fünf klinischen Isolate, bei denen die PCR-Tests und die 16S-rRNA-Gensequenzanalysen keine eindeutige Spezieszuordnung ermöglichten, konnten durch die Clusteranalyse der Microarraydaten weiterführend charakterisiert werden. Das Isolat SV73 wurde durch die biochemische Analyse des API® 20 Strep Systems der Mitisgruppe zugeordnet und anhand der PCR-Tests als *Streptococcus gordonii* typisiert. Die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse identifizierte das Isolat jedoch als *Streptococcus sanguinis*, was durch die Clusteranalyse bestätigt werden konnte. Das Isolat SV51 verhielt sich sowohl in der biochemischen Analyse als auch in den PCR-Tests wie ein *Streptococcus oralis* Isolat. Auf Grund der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse wurde das Isolat SV51 jedoch als *Streptococcus mitis* typisiert. Bei diesem Isolat unterstützte die Clusteranalyse das Resultat der biochemischen und der PCR-Typisierung. Das Isolat SV76 wurde durch biochemische Analysen der Mitisgruppe zugeordnet und durch die PCR-Tests und die Clusteranalyse als *Streptococcus parasanguinis* typisiert. Die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse identifizierte das Isolat SV76 jedoch als *Streptococcus australis*. Das Isolat SV98 wurde durch die biochemische Analyse der Gattung *Lactococcus* zugeordnet, während die PCR-Tests es als *Streptococcus constellatus* typisierten. Die Ergebnisse der Clusteranalyse separierten das Isolat SV98 hingegen von den Mitgliedern der Anginosusgruppe und ordneten es der phylogenetisch distinkten Salivariusgruppe zu. Die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse identifizierte das Isolat als *Staphylococcus pasteurii*. Das Isolat SV120 wurde durch die biochemische Analyse der Mitisgruppe zugeordnet und verhielt sich in den PCR-Tests wie ein *Streptococcus gordonii* Isolat. Die Ergebnisse der Clusteranalyse waren in diesem Fall nicht eindeutig. Das Isolat SV120 wurde einem *Streptococcus gordonii* und einem *Streptococcus parasanguinis* Isolat zugeordnet. Die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse separierte das Isolat jedoch vollständig von den analysierten Streptokokkenisolaten und identifizierte es als *Enterococcus faecium*.

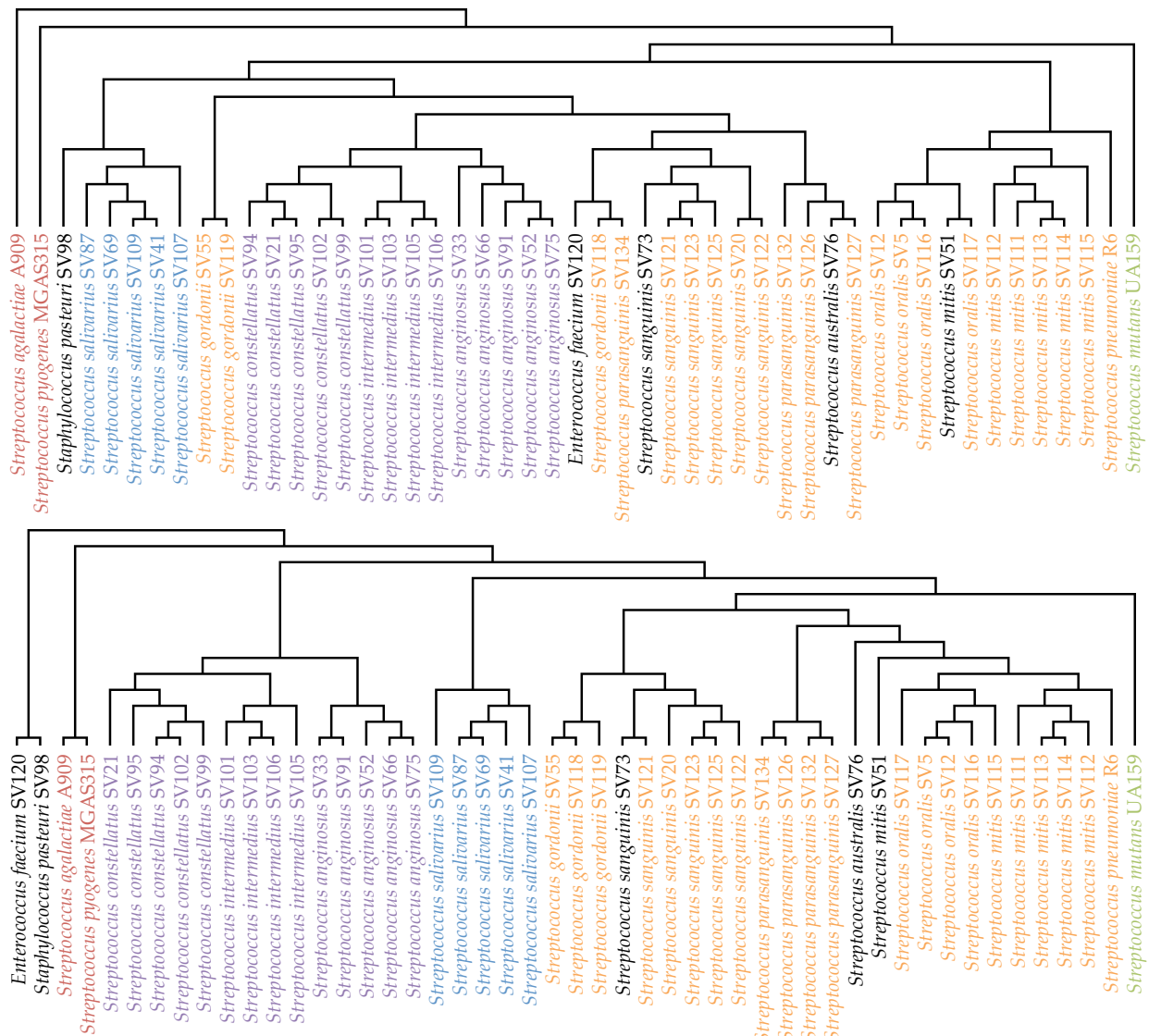
Die Darstellung der Clusteranalyse in Abbildung 4.2.2.1 ermöglichte nicht nur die Zuordnung der analysierten Isolate zu speziesspezifischen Gruppen, sondern auch einen Einblick in die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Isolaten, wie sie

sich anhand der genetischen Ausstattung mit Genen extrazellulärer Proteine darstellten. Die Speziestypisierung der klinischen Oralstreptokokkenisolate basierend auf der Clusteranalyse der Microarrayergebnisse konnte überwiegend durch *16S-rRNA*-Gensequenzanalysen bestätigt werden. Dennoch zeigten sich beim Vergleich der hierarchischen Baumdarstellung der Clusteranalyse (Abbildung 4.2.2.1) deutliche Unterschiede zur Darstellung der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken basierend auf vergleichenden *16S-rRNA*-Gensequenzanalysen (Abbildung 2.1). Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der Clusteranalysen und der Ergebnisse der *16S-rRNA*-Gensequenzanalysen sollte einen umfassenden Einblick in die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der analysierten Isolate ermöglichen (4.2.2.2).

### 4.2.2.2 Phylogenetische Analysen

Um einen umfassenden Einblick in die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der analysierten Isolate zu erhalten, wurden in Abbildung 4.2.2.2 die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen basierend auf den Clusteranalysen der Microarrayergebnisse (4.2.2.1) und auf *16S-rRNA*-Gensequenzanalysen (4.2.1) gegenübergestellt.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.2.2.2: Gegenüberstellung der phylogenetischen Analysen.** Dargestellt sind die hierarchisch dichotomen Baumdarstellungen der Beziehungen zwischen den analysierten Streptokokkenisolaten erstellt durch Clusteranalysen der Microarrayergebnisse (oben) sowie durch vergleichende Sequenzanalysen anhand eines 680bp-langen Bereichs des 16S-rRNA-Gens (unten). Die analysierten Streptokokkenisolaten wurden mit Spezies und Stammsammlungsnummer bezeichnet. Für die fünf nicht eindeutig typisierbaren Isolate wurde die Spezieszuordnung der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse angegeben (schwarz). Die Farbgebung der Beschriftungen teilt die eindeutig typisierbaren Isolate nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* ein. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot).

Anhand der vergleichenden 16S-rRNA-Gensequenzanalysen konnte ebenfalls ein Großteil der analysierten Isolate in distinkte Gruppen eingeteilt und somit einer Spezies zugeordnet werden. Abgesehen von den fünf schwer typisierbaren Isolaten SV51, SV73, SV120, SV76 und SV98, den Isolaten der Spezies *Streptococcus gordonii* sowie dem *Streptococcus parasanguinis* Isolat SV134, entsprach die Gruppeneinteilung der analysierten Isolate anhand der 16S-rRNA-Gensequenzanalysen den Ergebnissen der Clusteranalyse.

Die dichotomen Beziehungen der Gruppen zueinander zeigten jedoch in den beiden Abbildungen deutliche Unterschiede. Die Zweiteilung der Mitisgruppe in eine Untergruppe, die nur Isolate der Arten *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* umfasst (erste Mitisuntergruppe), und in eine Untergruppe, die die Isolate der Arten *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis* sowie *Streptococcus sanguinis* enthält (zweite Mitisuntergruppe), konnte in beiden Abbildungen beobachtet werden. Während die 16S-rRNA-Gensequenzanalysen die beiden Mitisuntergruppen als phylogenetisch geschlossene Gruppe darstellte, separierte die Clusteranalyse basierend auf den normalisierten Microarray-ergebnissen die beiden Mitisuntergruppen innerhalb der analysierten Oralstreptokokkenisolate voneinander. Auch die hierarchische Einteilung innerhalb der Mitisuntergruppen ließ deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden phylogenetischen Analysemethoden erkennen. Die erste Mitisuntergruppe ist in beiden Darstellungen gekennzeichnet durch die klare Aufteilung der Isolate in eine *Streptococcus oralis* Gruppe und eine *Streptococcus mitis* Gruppe. Die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse ordnete den Teststamm *Streptococcus pneumoniae* R6 bei dieser Aufteilung den *Streptococcus mitis* Isolaten zu. Anhand der Clusteranalyse der Microarraydaten wurde das *Streptococcus pneumoniae* Isolat R6 ebenfalls der ersten Mitisuntergruppe zugeordnet, wurde jedoch hierarchisch außerhalb der beiden anderen Streptokokkenarten dieser Untergruppe dargestellt.

Das schwer typisierbare Isolat SV51, das in der biochemischen Analytik und den PCR-Tests wie *Streptococcus oralis* reagierte, wurde auch in der Clusteranalyse eindeutig den *Streptococcus oralis* Isolaten zugeordnet. Die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse typisierte das Isolat hingegen als *Streptococcus mitis*, ordnete es jedoch nicht den übrigen Isolaten dieser Spezies zu, sondern separierte es von den übrigen Mitgliedern der ersten Mitisuntergruppe. Innerhalb der zweiten Mitisuntergruppe zeigten die Ergebnisse der 16S-rRNA-Gensequenzanalysen ebenfalls eine eindeutige Aufteilung der Isolate ihrer Spezies entsprechend, wobei das schwer typisierbare Isolat SV73 eindeutig den *Streptococcus sanguinis* Isolaten zugeordnet wurde. Die Gruppe der *Streptococcus sanguinis* Isolate wurde hierarchisch in direktem Kontakt zur Gruppe der *Streptococcus gordonii* Isolate dargestellt, während die *Streptococcus parasanguinis* Isolate eine distinkte Gruppe innerhalb der zweiten Mitisuntergruppe bildeten. Die Clusteranalyse basierend auf den Microarrayergebnissen stellte die Beziehungen der speziesspezifischen Gruppen in der zweiten Mitisuntergruppe auf gleiche Weise dar und bestätigte die Einteilung des Isolates SV73. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Zuordnung der *Streptococcus parasanguinis* und *Streptococcus gordonii* Isolate, die keinen ihrer Spezies entsprechenden Cluster bildeten. Das *Streptococcus australis* Isolat SV76 wurde den *Streptococcus parasanguinis* Isolaten zugeordnet. Das *Streptococcus parasanguinis* Isolat SV134 wurde hingegen von dieser Gruppe separiert und zusammen mit dem *Streptococcus gordonii* Isolat SV118 und dem *Enterococcus faecium* Isolat SV120 dargestellt. Die beiden übrigen Isolate der Spezies *Streptococcus gordonii* SV55 und SV119 bildeten eine eigene Gruppierung innerhalb der analysierten

Oralstreptokokkenisolate, aber deutlich getrennt von den übrigen Isolaten der Mitisgruppe. Durch die *16S-rRNA*-Gensequenzanalysen wurde das *Enterococcus faecium* Isolat SV120 zusammen mit dem *Staphylococcus pasteurii* Isolat SV98 von den analysierten Streptokokkenisolaten separiert. Weiterhin zeigte die Einordnung des Oralstreptokokkenisolates und Teststammes *Streptococcus mutans* UA159 deutliche Unterschiede zwischen den beiden phylogenetischen Analysemethoden. Während die *16S-rRNA*-Gensequenzanalyse das *Streptococcus mutans* Isolat innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken einer distinkten Gruppe hierarchisch zwischen der Mitisgruppe und der Salivariusgruppe zuordnete, separierte die Clusteranalyse das Isolat von den übrigen Oralstreptokokken. Die Teststämme aus der pyogenen Gruppe *Streptococcus pyogenes* MGAS315 und *Streptococcus agalactiae* A909 bildeten anhand der Ergebnisse der *16S-rRNA*-Gensequenzanalyse eine Gruppe außerhalb der analysierten Oralstreptokokkenisolate. Die Clusteranalyse der Microarray-ergebnisse bestätigte diese Separierung.

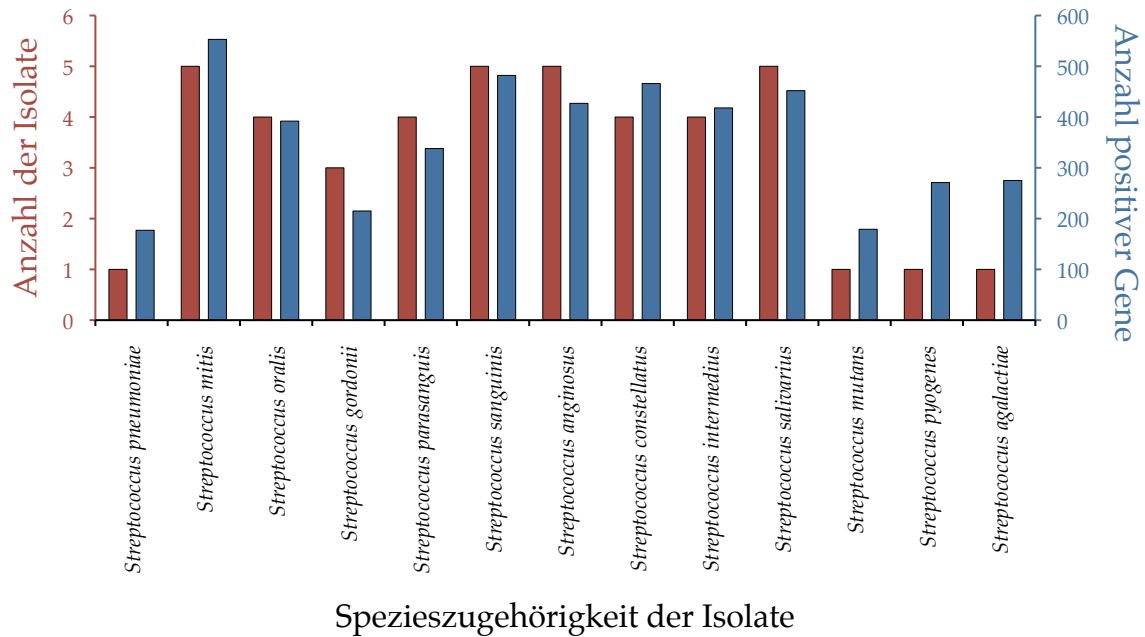
Die vergleichende Betrachtung verdeutlichte, dass der entwickelte Microarray in der Lage war, einen Großteil der hybridisierten Isolate in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *16S-rRNA*-Gensequenzanalyse nach Spezieszugehörigkeit zu trennen. Deutliche Unterschiede zu den auf *16S-rRNA*-Gensequenzanalyse basierenden phylogenetischen Beziehungen motivierten eine direkte Betrachtung von Vorkommen und Verbreitung virulenzrelevanter Gene innerhalb der analysierten Oralstreptokokkenarten.

### 4.2.3 Vorkommen und Verbreitung virulenzrelevanter Gene

Um einen Überblick über den Ursprung und die Verbreitung virulenzrelevanter Gene innerhalb der verschiedenen Streptokokkenarten der Oralstreptokokken zu ermöglichen (4.2.3.1), wurden die Signalintensitäten der Virulenzgensonden (3.5.3.1) der 40 eindeutig typisierbaren Oralstreptokokkenisolate (Tabelle 4.2.1) in binäre Präsenz-Absenz-Daten umgerechnet (3.5.3.3). Die Auswertung dieses Datensatzes sollte nicht nur einen tieferen Einblick in die Resultate der phylogenetischen Analysen (4.2.2.2) ermöglichen, sondern auch anhand einer funktionsbezogenen Analyse der Gensignale Ansätze zur Aufklärung der Pathogenität der analysierten klinischen Oralstreptokokkenisolate liefern (4.2.3.2).

#### 4.2.3.1 Überblick über Ursprung und Verbreitung virulenzrelevanter Gene

Abbildung 4.2.3.1.1 verdeutlicht, dass für einen Überblick über die Verteilung virulenzrelevanter Gene innerhalb der analysierten Arten der Oralstreptokokken die Vergleichbarkeit der Anzahl der Sondensignale für die einzelnen Streptokokkenarten hergestellt werden musste.



**Abbildung 4.2.3.1.1: Gegenüberstellung der Isolatanzahl und der Anzahl positiver Signale pro analysierter Streptokokkenart.** Dargestellt ist die Anzahl der in die Analyse einfließenden Isolate pro Spezies (rot) und die korrespondierende Anzahl positiver Gensignale (blau).

Für die vier Spezies *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* sowie *Streptococcus mutans* wurde zu Vergleichszwecken jeweils der Teststamm hybridisiert, der auch bei der Entwicklung des Microarrays benutzt wurde (3.5.1.1). Die hohe Anzahl positiver Signale der vier Teststämme erklärt sich anhand der Genausstattung des entwickelten Microarray (4.1.1). Die Anzahl der positiven Signale der Oralstreptokokkenarten korrelierte annähernd mit der Anzahl der Isolate, die für jede Spezies analysiert wurde. Um eine Vergleichbarkeit der Signalverteilungen der einzelnen Streptokokkenarten zu ermöglichen, wurde für die weitere Analyse die durchschnittliche Anzahl positiver Gensignale pro Isolat für jede Spezies berechnet. Dafür wurde die Anzahl der positiven Signale durch die Anzahl der für diese Spezies analysierten Isolate geteilt.

Um einen möglichst umfassenden Überblick über die Verteilung virulenzrelevanter Gene innerhalb der verschiedenen Oralstreptokokkenarten zu erhalten, sollte auch die Information der Spezies, aus der die Virulenzfaktorgene selektiert wurden, in die Auswertung einfließen. Abbildung 4.1.1 verdeutlichte, dass die Anzahl der selektierten Gene pro Streptokokkenart deutliche Unterschiede aufwies. Um in dieser zweiten Dimension ebenfalls eine Vergleichbarkeit der SONDENSIGNALE zu ermöglichen, wurde die bereits berechnete durchschnittliche Anzahl positiver Gensignale pro Isolat für jede Spezies durch die Anzahl der Gensonden pro Genursprungsspezies geteilt. Abbildung 4.2.3.1.2 zeigt die daraus resultierende Gegenüberstellung, in der die durchschnittliche Anzahl der positiven Gensignale pro Isolat für jede analysierte Spezies relativ zur Anzahl der spezieszugehörigen Gene ausgedrückt wurde.



**Abbildung 4.2.3.1.2: Überblick über Ursprung und Verteilung virulenzrelevanter Gene innerhalb der analysierten Streptokokkenarten.** Für jede analysierte Streptokokkenart ist die durchschnittliche Anzahl positiver Gensignale pro Isolat pro Anzahl spezieszugehöriger Gene dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl positiver Gensignale pro Isolat jeder analysierten Streptokokkenart wurde dafür durch die Anzahl von Genen des korrespondierenden Genursprungs geteilt. Diese berechnete Anzahl positiver Signale wird durch den Durchmesser der dargestellten Blasen repräsentiert. Die Farbdarstellung der Blasen fasst die analysierten Streptokokkenisolate entsprechend der Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* zusammen. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot). Die Spezieszugehörigkeit der analysierten Streptokokkenisolate ist unterhalb der Abbildung angegeben, die Genursprungsspezies links.

Die Aufschlüsselung der Signale nach Spezies und Genursprung in Abbildung 4.2.3.1.2 erlaubte nicht nur einen ausführlichen Überblick über Ursprung und

Verteilung von virulenzrelevanten Streptokokkengen innerhalb der analysierten Streptokokkenarten, sondern auch eine Überprüfung des entwickelten Microarray-systems und der angewandten Analysemethoden. Hohe Werte auf der Ursprungs-diagonalen zeigten, dass ein großer Anteil der Gene in ihrer Ursprungsspezies detektiert werden konnte. Die speziesübergreifenden Gensonden erwiesen sich als funktionell.

Bereits die Clusteranalyse (4.2.2.2) wies darauf hin, dass die genetische Ähnlichkeit zwischen den klinischen Oralstreptokokkenisolaten und den zwei Teststämmen aus der pyogenen Gruppe *Streptococcus pyogenes* MGAS315 und *Streptococcus agalactiae* A909 gering ist. Dies konnte anhand der Abbildung 4.2.3.1.2 bestätigt werden. Die beiden Teststämme *Streptococcus pyogenes* MGAS315 und *Streptococcus agalactiae* A909 erzeugten eine große Anzahl positiver Signale bei ihren eigenen Genen, zeigten aber vergleichsweise wenige Signale bei Genen aus anderen Streptokokkenarten. Bei *Streptococcus pyogenes* MGAS315 wurden jedoch einige Signale für Gene aus der Gruppe der G- und C-Streptokokkenart *Streptococcus dysgalactiae* nachgewiesen.

Die Separation des Teststammes *Streptococcus mutans* UA159 von den übrigen Oralstreptokokkenisolaten der Clusteranalyse entsprach nicht den Ergebnissen der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse (4.2.2.2). Diese Einordnung anhand der Clusteranalyse konnte ebenfalls auf die große Anzahl positiver Signale für Gene aus diesem Teststamm zurückgeführt werden.

Die Isolate der Arten *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* und *Streptococcus intermedius* fanden sich in der Clusteranalyse zur Anginosusgruppe zusammen (4.2.2.2). Ein Grund dafür war, dass alle drei Streptokokkenarten dieser Gruppe eine hohe Anzahl positiver Signale für Gene aus allen drei Anginosusgruppenspezies zeigten. Innerhalb der Anginosusgruppe ermöglichten Unterschiede in der Verteilung der Signale dieser Anginosusgruppengene eine Aufteilung der Isolate nach Spezieszugehörigkeit.

Die Aufteilung der Mitisgruppe in zwei Untergruppen, wie sie sowohl in der Clusteranalyse als auch bei den 16S-rRNA-Gensequenzvergleichen zu beobachten war (4.2.2.2), konnte anhand der vorliegenden Abbildung auf die Signalverteilung der Gene aus den Streptokokkenarten der ersten Mitisuntergruppe *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* zurückgeführt werden. Die Isolate dieser drei Streptokokkenarten zeigten eine hohe Anzahl positiver Signale für alle Gene dieser drei Spezies. Dies war bei den Isolaten der zweiten Mitisuntergruppe *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis* und *Streptococcus sanguinis* nicht zu beobachten. Diese zeigten vergleichsweise wenig positive Signale bei Genen aus Streptokokkenarten der Mitisgruppe, waren aber für Gene aus der eigenen Spezies weitgehend positiv. Die Signalverteilung bei den Genen, die aus den drei Streptokokkenarten der ersten Mitisuntergruppe selektiert wurden, beeinflusste nicht nur die Aufteilung der Mitisgruppe in die beiden Untergruppen, sondern konnte auch die deutliche Separation der Isolate der ersten Mitisuntergruppe von den übrigen Oralstreptokokkenisolaten in der Clusteranalyse erklären (4.2.2.2). Da die drei Spezies der ersten Mitisuntergruppe eine hohe Anzahl positiver Signale bei



Genen der ersten Mitisuntergruppe erzeugten, was bei allen anderen analysierten Oralstreptokokkenarten nicht zu beobachten war, separierte sich die erste Mitisuntergruppe deutlich von den übrigen Isolaten.

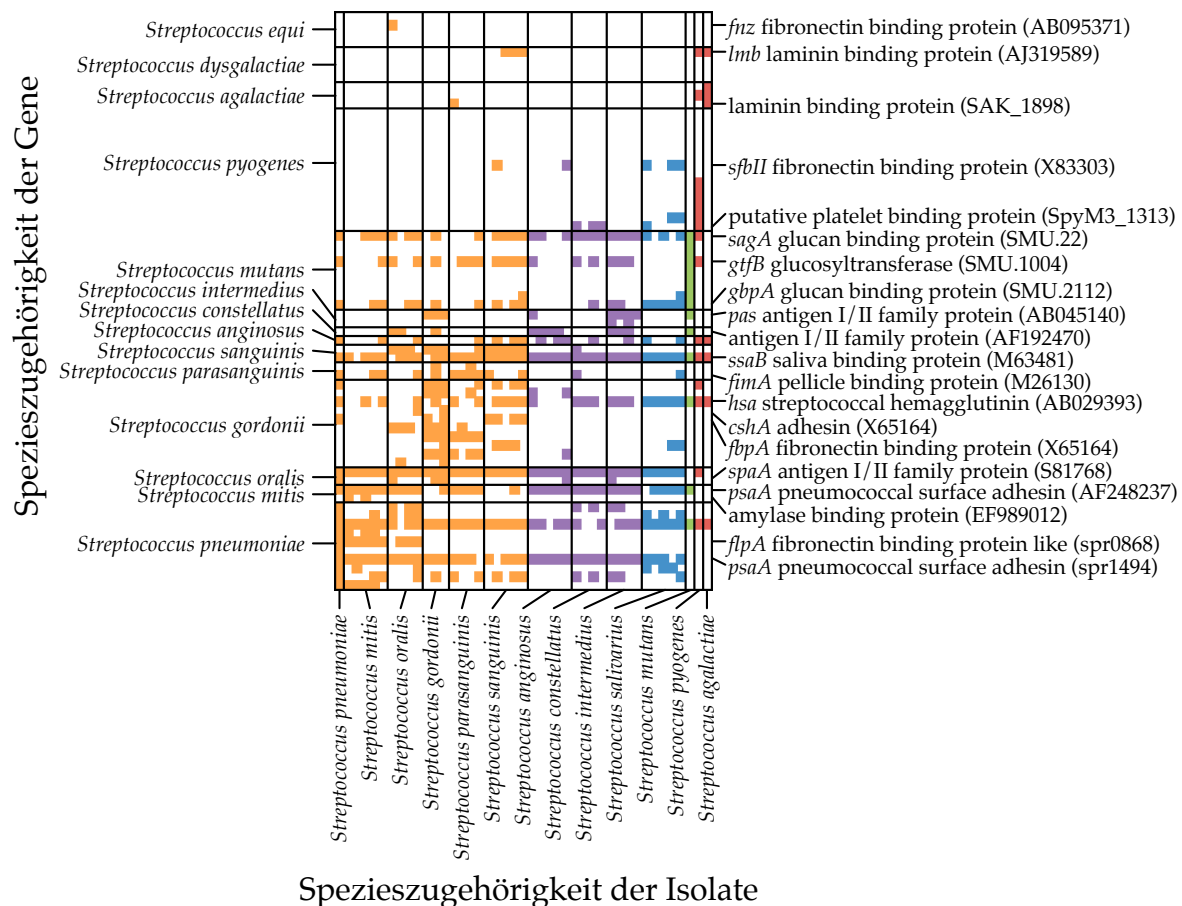
Der Teststamm *Streptococcus pneumoniae* R6, der eindeutig der ersten Mitisuntergruppe zugeordnet wurde (4.2.2.2), wurde durch die 16S-rRNA-Gensequenzanalysen innerhalb der *Streptococcus mitis* Isolate dargestellt. Die Clusteranalyse der Microarrayergebnisse ordnete das *Streptococcus pneumoniae* Isolat R6 jedoch hierarchisch außerhalb der *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* Isolate ein, ein Hinweis auf deutliche genetische Unterschiede in Bezug auf extrazelluläre Virulenzfaktoren.

Die Untersuchung verdeutlichte, dass die Gruppenbildung, die sich in der Clusteranalyse (4.2.2.2) abzeichnete, hauptsächlich auf der Verteilung von Oralstreptokokkengen beruhte. Gensonden aus phylogenetisch von den klinischen Oralstreptokokkenisolaten weit entfernten Spezies wie *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus equi* hatten kaum Einfluss auf die Clusterbildung, da sie vergleichsweise wenig positive Signale erzeugten. Die zusammenfassende Darstellung der Microarrayergebnisse in Abbildung 4.2.3.1.2 reduziert jedoch die Informationen der Daten bezüglich der Diversität in der genetischen Ausstattung einzelner Isolate. Daher konnte in dieser Darstellung die Verteilung einzelner Gene und funktioneller Gengruppen nicht wiedergegeben werden. Ein Großteil der Gene des entwickelten Microarray ließ sich jedoch anhand der beschriebenen Funktionen der von den Genen codierten Proteine zu Gruppen zusammenfassen. Dies ermöglichte eine virulenzfaktorgerichtete Auswertung der binären Datensätze (4.2.3.2).

### 4.2.3.2 Betrachtung einzelner Virulenzfaktorgruppen

Um Zusammenhänge zwischen der Pathogenität der Oralstreptokokken und der Präsenz bestimmter Virulenzfaktorgene zu untersuchen, wurden die Gensonden des entwickelten Microarray nach der Funktion des von den Genen codierten Proteins zusammengefasst. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Faktoren gelegt, die das Überleben der Bakterien im Blutstrom ermöglichen und über Adhäsion die Kolonisierung von Gewebestrukturen vermitteln.

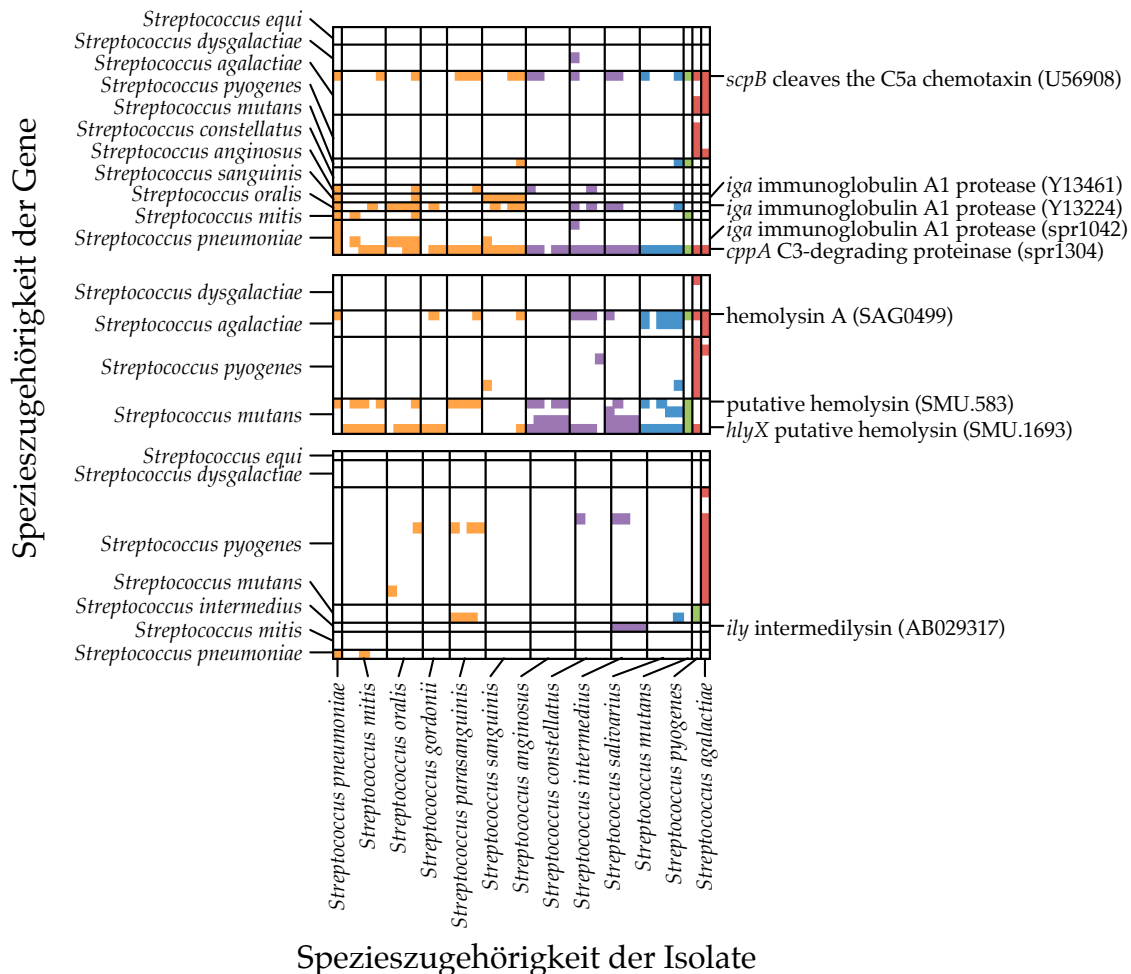
Die Bindung von Streptokokken an feste Oberflächen ist sowohl für das Überleben in der menschlichen Mundhöhle (2.1) als auch für das Überleben im menschlichen Blutstrom von großer Bedeutung. Durch Adhäsion wird die Kolonisierung und die Entwicklung schützender sessiler Gemeinschaften (Biofilme) eingeleitet. Abbildung 4.2.3.4 zeigt eine Auflistung aller Sonden des Microarray, deren Gene für Adhäsine codieren.



**Abbildung 4.2.3.2.1: Verteilung der Signale für Gene von Adhäsinen.** Dargestellt ist die Verteilung der positiven Signale für Sonden, deren Gene für Proteine codieren, die als Adhäsine beschrieben sind. Die Farbdarstellung unterteilt die Arten nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus*. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot). Die Spezieszugehörigkeit der analysierten Isolate wurde unterhalb, die Spezieszugehörigkeit der ausgewählten Gene links der Abbildung angegeben. Gensonden mit auffälliger Signalverteilung wurden rechts der Abbildung mit Genbezeichnung, Beschreibung des Genproduktes und Gennummer aufgelistet.

Um Gewebe kolonisieren zu können, besitzen obligat pathogene Streptokokken der pyogenen Gruppe Proteine, die eine Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix ermöglichen (2.2.2). Gene von Adhäsinen für Fibronektin (*sfbI*, *gfbA*, *prtF*, *fnz*), Kollagen (*cbp*) oder Laminin (*lmb*) konnten bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten nur vereinzelt nachgewiesen werden. Auch Gene von Oralstreptokokkenproteinen zur Bindung von Fibronektin (*fbpA*, *cshA*) oder Kollagen (*sspA*, *sspB*) erzeugten nur wenige positive Signale. Adhäsine, die die Bindung an orale Oberflächen vermitteln, konnten dagegen weitaus häufiger anhand ihrer Gene (*sagA*, *gtfB*, *gbpA*, *ssaB*, *hsa*) nachgewiesen werden. Diese zeigten eine breite Verteilung positiver Signale über alle analysierten Oralstreptokokkenarten hinweg. Zwei dieser Oberflächenproteine (Hsa, SsaB) vermitteln in der Mundhöhle die Bindung an den Pellikel, wurden jedoch auch als Adhäsine für Thromben beschrieben.

Oralstreptokokken erhalten von ihrem natürlichen Lebensraum der menschlichen Mundhöhle aus regelmäßig Zugang zum Blutkreislauf (2.2.2). Das Immunsystem bekämpft solche Oralstreptokokkenbakteriämien äußerst effektiv. Dennoch werden immer wieder Fälle beschrieben, in denen Oralstreptokokken im Blutkreislauf persistieren und Infektionen hervorrufen. Abbildung 4.2.3.5 zeigt eine Auflistung aller Sonden, deren Gene für Faktoren codieren, die das Überleben der Bakterien im menschlichen Blutstrom und Gewebe ermöglichen.



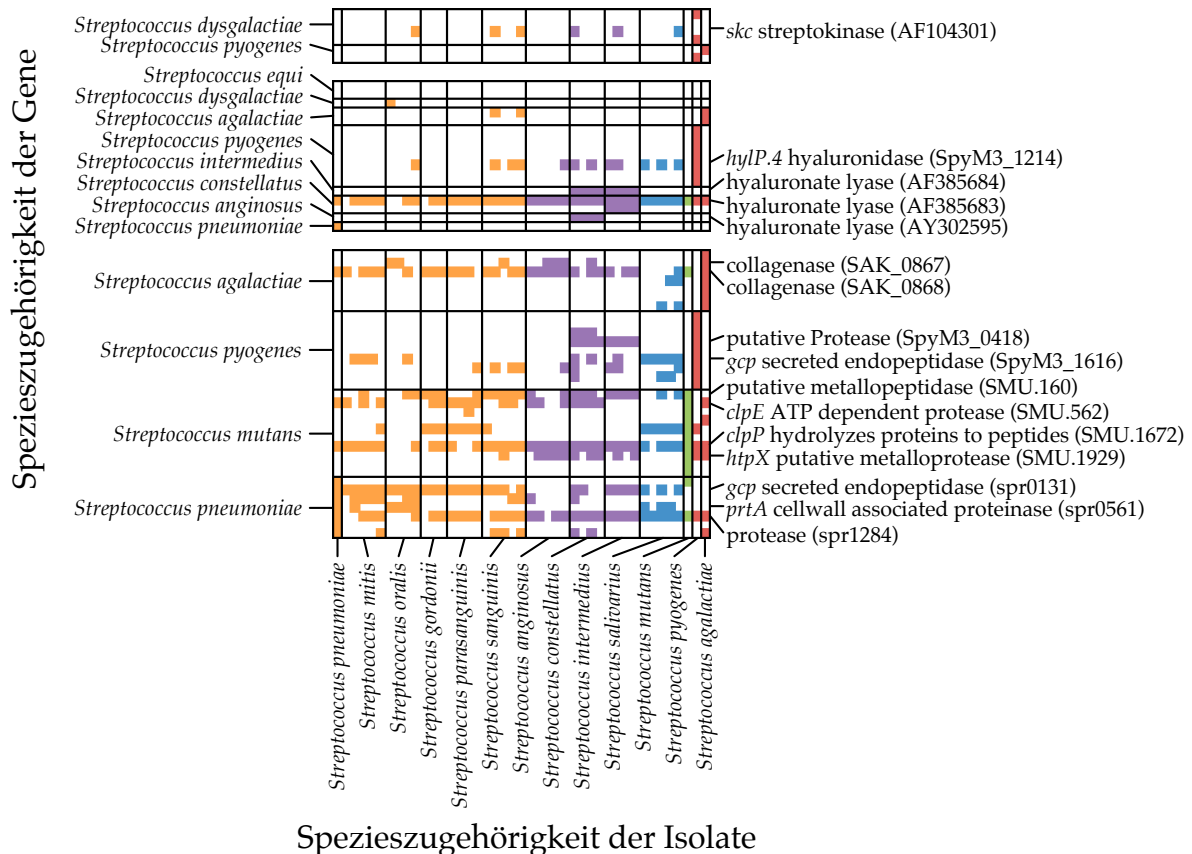
**Abbildung 4.2.3.2.2: Verteilung der Signale für Gene antiphagozytischer Faktoren, Hämolsysine und Exotoxine.** Dargestellt ist die Verteilung der positiven Signale für Sonden, deren Gene für Proteine codieren, für die eine antiphagozytische Funktion beschrieben ist (*oben*) und die als Hämolsysine (*mitte*) oder Exotoxine (*unten*) beschrieben sind. Die Farbdarstellung unterteilt die Arten nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus*. Unterschieden werden Mitisgruppe (*gelb*), Anginosusgruppe (*violett*), Salivariusgruppe (*blau*), Mutansgruppe (*grün*) sowie pyogene Gruppe (*rot*). Die Spezieszugehörigkeit der analysierten Isolate wurde unterhalb, die Spezieszugehörigkeit der ausgewählten Gene links der Abbildung angegeben. Gensonden mit auffälliger Signalverteilung wurden rechts der Abbildung mit Genbezeichnung, Beschreibung des Genproduktes und Gennummer aufgelistet.

Obligat pathogene Streptokokken der pyogenen Gruppe besitzen mehrere Mechanismen, die das Überleben der Bakterien während der Konfrontation mit dem Immunsystem ermöglichen (*obere Abbildung*). Die Anreicherung von Fibrinogen auf der Bakterienoberfläche stellt einen äußerst effektiven Schutz gegen phagozytische Zellen des Immunsystems dar. Gene, die für fibrinogenbindende Oberflächenproteine codieren (*prtF*, *emm*), konnten bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten jedoch nicht nachgewiesen werden. Um die spezifische Immunabwehr zu umgehen, sind manche Streptokokken der pyogenen Gruppe in der Lage, humane Immunglobuline so auf der Bakterienoberfläche zu binden, dass sie ihre opsonisierende Wirkung verlieren. Die Gene solcher antiphagozytischen Oberflächenproteine (*prtG*, *mag*, *mig*) wurden bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten ebenfalls nicht detektiert. Ein weiterer bakterieller Mechanismus, der dazu dient, der Opsonisierung zu entgehen, ist die spezifische Spaltung der Faktoren des Komplementsystems. Von den Genen der Komplementfaktorproteasen, die für den Microarray ausgewählt wurden, erzeugten zwei (*scpB*, *cspA*) in nahezu allen analysierten Oralstreptokokkenarten deutlich positive Signale. Einige Proteasen, die spezifisch humanes IgA1 spalten und so die Speichelagglutination unterbinden, um die Persistenz der Oralstreptokokken in der Mundhöhle zu ermöglichen, konnten hingegen anhand ihrer Gene (*iga*) in einigen Isolaten speziesübergreifend nachgewiesen werden.

Hämolsine stellen einen weiteren antiphagozytischen Mechanismus dar, der bei pathogenen Streptokokken der pyogenen Gruppe beschrieben wurde (*mittlere Abbildung*). Zwei Hämolsine von *Streptococcus pyogenes* sind nicht nur in der Lage, Erythrozyten zu lysieren, indem sie die Zellmembran zerstören, sondern wirken auch zytotoxisch auf die Zellen des Immunsystems. Die Gene dieser Hämolsine (*sls*, *slo*) konnten bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten jedoch nicht nachgewiesen werden. Dennoch erzeugten einige Gene, die für mögliche Hämolsine codieren (*hlyX*, *hemolysinA*), positive Signale bei einzelnen Oralstreptokokkenisolaten. Die Isolate der Anginosusgruppe, für die vereinzelt eine  $\beta$ -Hämolysie beschrieben wurde, zeigten eine tendenziell höhere Anzahl positiver Signale für Hämolsine als die Isolate anderer Gruppen. Zudem wurde das Gen des für *Streptococcus intermedius* beschriebenen Intermedilysins (*ily*) spezifisch in den Isolaten dieser Spezies nachgewiesen.

Einige pathogene Streptokokken der pyogenen Gruppe verhindern die effektive Bekämpfung bakterieller Infektionen durch das Immunsystem, indem sie eine überschießende Immunantwort (streptokokkeninduziertes Toxisches Schock-syndrom) induzieren. Dazu sezernieren die Bakterien sogenannte pyogene Exotoxine (*untere Abbildung*). Solche drastischen Krankheitsbilder wurden bei Oralstreptokokkeninfektionen äußerst selten beschrieben, was im Einklang mit den Ergebnissen der durchgeführten Microarrayanalysen steht. Keines der zahlreichen Exotoxingene auf dem Microarray (*speB*, *szeM*, *speA*, *speJ*, *speC*, *speM*, *ssa*) erzeugte positive Signale.

Oralstreptokokken sind nicht in der Lage, den Pellikel und die oralen Schleimhäute aktiv zu durchdringen, um daraufhin das darunterliegende Gewebe zu kolonisieren. Infektionen innerer Organe hervorgerufen durch Oralstreptokokken gehen jedoch mit einer allmählichen Schädigung des umliegenden Gewebes einher, was die weitere Ausbreitung der Bakterien ermöglicht. Abbildung 4.2.3.6 zeigt eine Auflistung aller Sonden, deren Gene für sogenannte Spreading-Faktoren codieren, die die Mobilität der Bakterien im menschlichen Gewebe erhöhen.



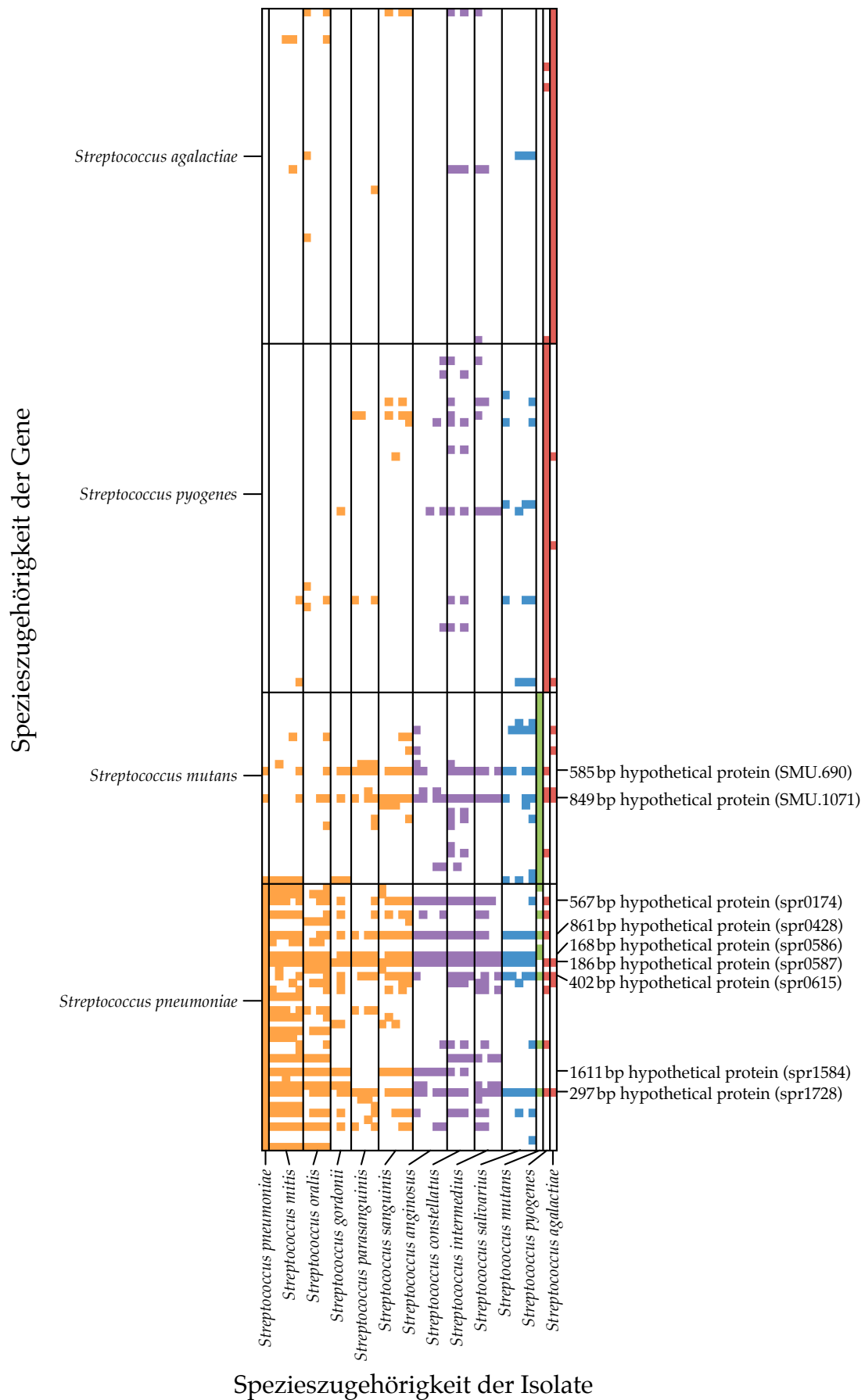
**Abbildung 4.2.3.2.3: Verteilung der Signale für Gene von Spreading-Faktoren.** Dargestellt ist die Verteilung der positiven Signale für Sonden, deren Gene für Proteine codieren, für die eine plasminogenaktivierende Funktion beschrieben ist (*oben*) und die als Hyaluronidase (*mitte*) oder Protease (*unten*) beschrieben sind. Die Farbdarstellung unterteilt die Arten nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus*. Unterschieden werden Mitisgruppe (*gelb*), Anginosusgruppe (*violett*), Salivariusgruppe (*blau*), Mutansgruppe (*grün*) sowie pyogene Gruppe (*rot*). Die Spezieszugehörigkeit der analysierten Isolate wurde unterhalb, die Spezieszugehörigkeit der ausgewählten Gene links der Abbildung angegeben. Gensonden mit auffälliger Signalverteilung wurden rechts der Abbildung mit Genbezeichnung, Beschreibung des Genproduktes und Gennummer aufgelistet.

Oralstreptokokken erzeugen nicht die dramatischen Gewebeschädigungen, wie sie einige Streptokokken der pyogenen Gruppe durch Aktivierung von Plasminogen hervorrufen (nekrotisierende Fasiitis). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen

der Microarrayanalysen. Nur eines der Gene, die für plasminogenaktivierende Proteine codieren (*skc*), erzeugte vereinzelt positive Signale bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten (*obere Abbildung*).

Eine weitere Gruppe bakterieller Proteine, die zur Zersetzung des menschlichen Gewebes beiträgt, sind Hyaluronidasen (*mittlere Abbildung*). Diese bei pathogenen Streptokokken der pyogenen Gruppe als Spreading-Faktoren beschriebenen Enzyme zerstören das Hyaluronsäurenetzwerk der extrazellulären Matrix und erleichtern dadurch die weitere Ausbreitung der Bakterien im Gewebe. Mehrere Hyaluronidasensonden aus unterschiedlichen Spezies erzeugten bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten positive Signale mit speziesübergreifender Verteilung.

Im Rahmen der Studie konnten zudem Hinweise auf mehrere Gene extrazellulärer Proteasen bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten erkannt werden (*untere Abbildung*). Viele dieser Proteasen sind bisher jedoch nicht auf eine Funktion als Virulenzfaktor untersucht. Aufgaben als Spreading-Faktoren und in der Manipulation der Immunantwort liegen aber nahe. Deshalb empfehlen sich dahingehende Untersuchung.



**Abbildung 4.2.3.2.4 (vorherige Seite): Verteilung der Signale für Gene hypothetischer Proteine.** Dargestellt ist die Verteilung der positiven Signale für Sonden, deren Gene für Proteine codieren, für die bisher keine Funktion beschrieben ist. Die Farbdarstellung unterteilt die Arten nach Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus*. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot). Die Spezieszugehörigkeit der analysierten Isolate wurde unterhalb, die Spezieszugehörigkeit der ausgewählten Gene links der Abbildung angegeben. Gensonden mit auffälliger Signalverteilung wurden rechts der Abbildung mit Genlänge, Genbezeichnung und Gennummer aufgelistet.

Da aus den vier Teststämmen *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus agalactiae* A909, *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159 alle Gene, die für extrazelluläre Proteine codieren, für den Microarray ausgewählt wurden (3.5.1.1), befanden sich in der Auswahl auch eine Vielzahl von Genen unbekannter Funktion. Gene aus *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus mutans*, die für hypothetische Proteine codieren, erzeugten bei den Oralstreptokokken wenige positive Signale. Bei Genen hypothetischer Proteine aus *Streptococcus pneumoniae* war das anders. Diese zeigten eine hohe Anzahl speziesübergreifender Signale. Zwei Gene, die für auffallend kurze hypothetische Peptide codieren (*spr0586*, *spr0587*), erzeugten bei nahezu allen analysierten Oralstreptokokkenisolaten deutlich positive Signale.

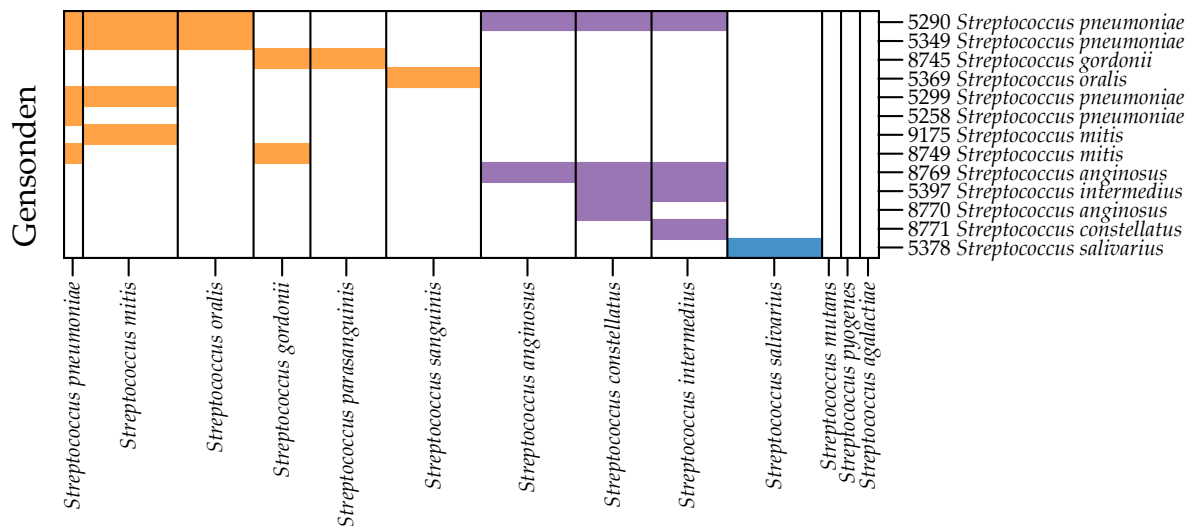
Die Darstellung der erzeugten Präsenz-Absenz-Daten geordnet nach Funktion der Virulenzfaktoren ermöglichte die Identifizierung mehrerer Kandidaten, die zur Aufklärung der Pathogenität der analysierten Oralstreptokokkenisolate näher betrachtet werden sollten. Die bei nahezu allen Isolaten nachzuweisenden Gene der Thrombozytenadhäsine aus *Streptococcus sanguinis* (*ssab*) und *Streptococcus gordonii* (*has*) stellen eine mögliche Erklärung für die spezifische Adhäsion von Oralstreptokokken an geschädigtes Herzklappengewebe dar. Zudem wurden mögliche Genhomologe von zwei Komplementfaktorproteasen in vielen Oralstreptokokkenisolaten gefunden (*scpB*, *cspA*), die die Opsonisierung der Bakterien unterbinden und somit die Persistenz im Blutstrom ermöglichen. Die analysierten Oralstreptokokken besitzen nicht das enorme Potenzial zur Gewebeschädigung, wie es bei obligat pathogenen Streptokokken der pyogenen Gruppe durch plasminogenaktivierende Proteine vermittelt wird. Dennoch konnte eine interessante Signalverteilung bei einigen Genen von Hyaluronidasen und extrazellulären Proteasen, darunter auch zwei Kollagenasen, bei den analysierten Oralstreptokokkenisolaten beobachtet werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nur die Isolate der Spezies *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* eine hohe genetische Ähnlichkeit in Bezug auf virulenzassoziierte Gene zu einer obligat pathogenen Streptokokkenart (*Streptococcus pneumoniae*) aufwiesen. Dies legt nahe, dass die übrigen Vertreter aus der Gruppe der Oralstreptokokken eigenständige Virulenzmechanismen besitzen, von denen bisher nur wenige bekannt sind.



#### 4.2.4 Identifizierung diagnostischer Sonden

Anhand der durchgeführten Microarrayanalysen wurde eine große Anzahl synthetischer Oligonukleotidsonden mit Hilfe der Sammlung klinischer Viridansstreptokokkensisolate auf eine spezies- oder gruppenspezifische Verteilung der Gensignale durchsucht. Abbildung 4.2.4 zeigt eine Auswahl von Sonden, die bei der angewendeten Schwellenwertberechnung (4.1.5.2) diesen Kriterien entsprachen.



#### Spezieszugehörigkeit der Isolate

**Abbildung 4.2.4: Verteilung der Signale spezies- oder gruppenspezifischer Sonden.** Dargestellt ist die Verteilung der positiven Signale für Sonden, die bei der benutzten Schwellenwertberechnung eine spezies- oder gruppenspezifische Verteilung innerhalb der Signale der analysierten Streptokokkenisolate zeigten. Für jede Gensonde ist rechts die Sondennummer sowie die Genursprungsspezies angegeben. Die Viridansstreptokokkenisolate sind geordnet nach Spezies- und Gruppenzugehörigkeit. Die farbliche Kennzeichnung fasst die Arten entsprechend der Gruppierungen innerhalb der Gattung *Streptococcus* zusammen. Unterschieden werden Mitisgruppe (gelb), Anginosusgruppe (violett), Salivariusgruppe (blau), Mutansgruppe (grün) sowie pyogene Gruppe (rot). Die Spezieszugehörigkeit der Isolate wurde unterhalb der Abbildung angegeben.

Mit Hilfe der dargestellten Sonden kann über ein einfaches Ausschlussverfahren jedes analysierte Oralstreptokokkenisolat nach Gruppenzugehörigkeit und Spezies typisiert werden. Die Spezifitäten dieser Sonden müssen in einer weiterführenden Untersuchung mit einer größeren Anzahl hybridisierter Isolate verifiziert werden.

## 5 Diskussion

Oralstreptokokken gehören zur natürlichen Mundraumflora des Menschen (2.1). Von den zwölf Arten der Gattung *Streptococcus*, die unter dem Begriff Oralstreptokokken zusammengefasst werden, stellt *Streptococcus mutans* als Haupterreger von Zahnkaries die einzige Spezies dar, die in der Mundhöhle des Menschen als Pathogen eingestuft werden muss (2.2.1). Gelangen Oralstreptokokken aus ihrem natürlichen Lebensraum in andere Regionen des menschlichen Körpers, können sie dort jedoch ein beachtliches pathogenes Potenzial entfalten und schwere Infektionen verursachen (2.2.2). Wie Oralstreptokokken die Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems umgehen, im Blutkreislauf persistieren und Gewebestrukturen des menschlichen Körpers kolonisieren, ist trotz intensiver Forschungsarbeit heute noch weitgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen speziesübergreifenden Virulenzfaktormicroarray zu entwickeln und mit dessen Hilfe einen Einblick in die phylogenetischen Beziehungen und das Repertoire der Pathogenitätsmechanismen der Oralstreptokokken zu erlangen (2.3).

Um anhand von Clusteranalysen der Microarraysignale einen Einblick in die phylogenetischen Beziehungen der analysierten Oralstreptokokkenisolate zu bekommen, wurde die Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Hybridisierungsexperimente hergestellt. Dazu wurden Kontrollen in den entwickelten Microarray integriert, die es ermöglichten, interexperimentelle Abweichungen zwischen den Hybridisierungen zu detektieren und mathematisch auszugleichen. Die in Abbildung 4.1.5 beobachteten Abweichungen zwischen den Signalen der Testhybridisierung einer Probe auf den beiden Microarrays eines Slides konnten auf die experimentelle Durchführung der Hybridisierungsreaktion zurückgeführt werden. Die genaue Ursache der Variabilität der Hybridisierungsergebnisse wurde nicht identifiziert. Vorversuche hatten allerdings gezeigt, dass die Diffusion des Hybridisierungsgemisches zwischen Microarrayslide und Deckgläschen einen deutlichen Einfluss auf die Signalintensitäten hatte. Dieser Effekt konnte praktisch jedoch nicht beeinflusst werden (Daten nicht gezeigt). Der Ausgleich der interexperimentellen Abweichungen erfolgte deshalb anhand der integrierten Hybridisierungskontrollen (4.1.2.3). Dazu wurde eine geeignete mathematische Signalnormalisierungsmethode entwickelt, die den nichtlinearen Fehler anhand einer Kontrollenreihe aus Hybridisierungskontrollen und Druckpufferkontrolle signalabhängig ausgleichen konnte (4.1.5.1). Die Effizienz dieser neuentwickelten Normalisierungsmethode konnte sowohl durch die Ergebnisse der Testhybridisierung (Abbildung 4.1.5.1.3) als auch durch den Einfluss der Normalisierung auf den gesamten Datensatz der 49 analysierten Isolate (Abbildung 4.1.5.1.5) bestätigt werden.

Die Clusteranalyse der normalisierten Microarraysignale aller 49 Isolate teilte die Isolate ihrer Spezies entsprechend in distinkte Gruppen ein. Dies ermöglichte die Anwendung des entwickelten Microarraysystems als Methode zur bakteriellen Speziestypisierung, deren Potenzial im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft wurde. Die Ergebnisse der Spezieszuordnung durch die Clusteranalyse stimmten bei den Oralstreptokokkenisolaten der Arten *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* und *Streptococcus salivarius* (Tabelle 4.2.1.1) mit den Ergebnissen der PCR-Tests und der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse überein. Die Einordnung der *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus parasanguinis* Isolate durch die Clusteranalyse zeigte hingegen keine eindeutige speziesspezifische Gruppenbildung. Die Ursachen für diese Einteilung werden durch weiterführende molekularbiologische und Microarrayanalysen mit größerem Probenumfang analysiert.

Die Auswahl der fünf Isolate SV73, SV51, SV76, SV98 und SV120 (Tabelle 4.2.1.2), bei denen sowohl die biochemische Analytik des API® 20 Strep Systems als auch die PCR-Tests und 16S-rRNA-Gensequenzanalyse keine übereinstimmende Spezieszuordnung lieferten, bildeten die Grundlage für eine weiterführende Überprüfung der Anwendbarkeit des entwickelten Microarraysystems zur bakteriellen Speziestypisierung. Mit dem Isolat SV73 wurde ein Oralstreptokokkenisolat ausgewählt, das eindeutig der Mitisgruppe zugeordnet werden konnte. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der drei Speziestypisierungsmethoden verdeutlichte jedoch die Komplexität der exakten Speziesbestimmung bei diesem Isolat. Die Clusteranalyse der Microarraysignale ordnete das Isolat SV73 eindeutig den *Streptococcus sanguinis* Isolaten zu und bestätigte damit das Resultat der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse, die sich auf eine sehr detaillierte Datenbank stützt und somit die momentan verlässlichste Speziestypisierungsmethode darstellt. Nur anhand dieser umfassenden 16S-rRNA-Gensequenz-Datenbank war es auch möglich, das Isolat SV76 als *Streptococcus australis* zu identifizieren. Alle vier Speziestypisierungsmethoden beruhen auf einer Spezieszuordnung anhand der Ergebnisse von Vergleichsstämmen. Sowohl die Anzahl als auch die Speziesverteilung dieser Vergleichsstämme bestimmt die Genauigkeit der Methoden. Da bei den erfolgten Microarrayanalysen keine Vergleichsstämme der selten aus der menschlichen Mundhöhle isolierten Spezies *Streptococcus australis* vorhanden waren, wurde das Isolat SV76 dem nächsten Verwandten dieser Spezies *Streptococcus parasanguinis* zugeordnet (Willcox *et al.*, 2001). Diese ausführliche Speziestypisierung des Blutkulturisolates SV76 konnte zum ersten Mal einen Hinweis auf ein humanpathogenes Potenzial der Spezies *Streptococcus australis* geben. Die Anwendbarkeit der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse zur bakteriellen Speziestypisierung ist allerdings limitiert durch den hohen Konservierungsgrad des 16S-rRNA-Gens. Dieser führt dazu, dass Arten mit sehr geringer phylogenetischer Distanz zueinander, wie *Streptococcus oralis* und *Streptococcus mitis* nicht immer verlässlich unterscheidbar sind (Kilian *et al.*, 2008). Die Typisierungsergebnisse des Isolates SV51 verdeutlichten, dass spezialisierte Methoden, wie die PCR-Tests oder

die Microarrayclusteranalysen, die dafür entwickelt wurden, eine Auswahl von Arten einer Gattung eindeutig zu identifizieren, bei der Unterscheidung von Isolaten geringer phylogenetischer Distanz deutliche Vorteile besitzen. Wie die Ergebnisse der Speziestypisierung der Isolate SV98 und SV120 zeigten, stoßen solche spezialisierten Speziestypisierungsmethoden jedoch bei phylogenetisch entfernten Spezies an ihre Grenzen. Die Vergleichsmöglichkeiten bei der Spezieszuordnung durch den entwickelten Microarray waren sowohl durch die Ausstattung mit vorwiegend streptokokkenspezifischen Gensonden als auch durch die in dieser Studie getroffene Stammauswahl begrenzt. Wie sich diese Einschränkungen auf die phylogenetische Clusteranalyse auswirkten wurde mit zwei Isolaten aus der Ordnung *Lactobacillales* überprüft, dem *Staphylococcus pasteurii* Isolat SV98 und dem *Enterococcus faecium* Isolat SV120. Der Vergleich der 16S-rRNA-Gensequenzen separierte SV98 und SV120 von den Streptokokken, und der Datenbankvergleich identifizierte sie als *Staphylococcus pasteurii* und *Enterococcus faecium*. Die arraybasierte Clusteranalyse aber ordnete *Staphylococcus pasteurii* SV98 dem Cluster aus *Streptococcus salivarius* Stämmen zu und gruppierte *Enterococcus faecium* SV120 mit *Streptococcus gordonii* SV118 und *Streptococcus parasanguinis* SV134. Auffälligerweise kann die Spezies *Enterococcus faecium* wie die analysierten Oralstreptokokkenarten regelmäßig aus der menschlichen Mundhöhle isoliert werden (Cogulu *et al.*, 2008). Zudem zeigt *Enterococcus faecium* ein ähnliches Pathogenitätspotential wie die Mitglieder der Oralstreptokokken (Martínez-Odriozola *et al.*, 2007). Neben diesen ökologischen und pathogenetischen Ähnlichkeiten rücken auch die Ergebnisse der biochemischen Analyse und der PCR-Tests *Enterococcus faecium* in die Nähe von Streptokokken der Mitisgruppe. Ob signifikante genetische Ähnlichkeiten dafür verantwortlich sind, bleibt zu überprüfen.

Diese ausführlichen Tests zur Speziestypisierung verdeutlichten, dass das große Potenzial des entwickelten Microarraysystems im Vergleich zu den anderen Speziestypisierungsmethoden vor allem in der einfach zu variierenden uneingeschränkten Wahl der Vergleichsstämme liegt. Dies ermöglicht nicht nur die effiziente Anpassung der Methode an Art und Anzahl der zu differenzierenden Spezies, sondern erweitert mit jeder durchgeführten Hybridisierung die Auswahl an Vergleichsstämmen, auf denen die Typisierung des Microarraysystems beruht. Erste Ergebnisse einer weiterführenden Anwendung des Microarrays zur Differenzierung und Charakterisierung klinischer Isolate aus der Gruppe der G- und C-Streptokokken sind ein weiterer Beleg für die Anwendbarkeit des entwickelten Microarraysystems als Speziestypisierungsmethode (Daten nicht gezeigt). Neben der direkten Anwendung des Microarrays zur Speziestypisierung stellten die im Zuge der Signalauswertung identifizierten Sonden mit gruppen- oder speziesspezifischer Signalverteilung eine Vorarbeit zur Entwicklung eines praxisorientierten diagnostischen Microarraysystems und anderen hybridisierungsbasierten Diagnosemethoden (fluorescence *in situ* hybridization, PCR) dar.

Der Einblick in die phylogenetischen Beziehungen zwischen den analysierten Isolaten, den die Clusteranalysen der normalisierten Microarraysignale ermöglichten, wurde mit den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse der 16S-rRNA-Gensequenzanalysen verglichen (4.2.2.2). Die Einordnung der Isolate in speziesspezifische Gruppen, wie sie durch die arraybasierte Clusteranalyse erfolgte, deckte sich größtenteils mit den Ergebnissen der 16S-rRNA-Gensequenzanalysen. Die beiden Analysemethoden zeigten jedoch auffällige Unterschiede bei der hierarchischen Einordnung der Mitisgruppe sowie der Teststämme *Streptococcus pneumoniae* R6 und *Streptococcus mutans* UA159. Sowohl die Ergebnisse der 16S-rRNA-Gensequenzanalyse als auch die Clusteranalyse der Microarraysignale unterteilten die Mitisgruppe in eine Untergruppe, die nur Isolate der Arten *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* umfasst (erste Mitisuntergruppe), und in eine Untergruppe, die Isolate der Arten *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis* sowie *Streptococcus sanguinis* enthält (zweite Mitisuntergruppe). Während die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse die beiden Untergruppen in phylogenetischer Nähe zueinander darstellte, separierte die arraybasierte Clusteranalyse die Isolate der ersten Mitisuntergruppe deutlich von den Isolaten der zweiten Mitisuntergruppe. Abbildung 4.2.3.1.2 verdeutlicht die sehr ausgeprägte genetische Ähnlichkeit der drei Spezies *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae*, die zu dieser hierarchischen Separation führt.

Dieser hohe Grad an genetischer Ähnlichkeit steht nicht nur im Einklang mit den Ergebnissen einer vergleichenden Untersuchung von *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* mit einem *Streptococcus pneumoniae* Vollgenommicroarray (Hakenbeck *et al.*, 2001), sondern stellt offensichtlich auch ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal zwischen den drei Arten der ersten Mitisuntergruppe und den übrigen Oralstreptokokken dar. Diese Ergebnisse legen den Vorschlag nahe, die Mitisgruppe in zwei taxonomisch eigenständige Gruppen aufzuteilen: eine Mitisgruppe und eine Sanguinisgruppe. Bei anderen Methoden zur phylogenetischen Analyse, die auf Sequenzvergleichen konservierter Genbereiche von intrazellulären Nukleinsäuren oder Haushaltsproteinen basieren, fiel die Separation innerhalb der Mitisgruppe deutlich geringer aus (Kawamura *et al.*, 1995; Hoshino *et al.*, 2005). Die Clusteranalyse der Microarraysignale vergleicht die analysierten Isolate hingegen basierend auf Informationen zur Präsenz und Homologie von 776 Genen extrazellulärer Faktoren. Dadurch wurden die Isolate nicht nur anhand genetischer Ähnlichkeit, sondern auch auf der Grundlage von pathogenitäts- und ökologiebestimmenden Merkmalen verglichen. Die Vorteile einer solchen Betrachtungsweise wurden nicht nur bei der Analyse der Mitisuntergruppen ersichtlich, sondern auch bei der hierarchischen Einordnung des bedeutenden Humanpathogens *Streptococcus pneumoniae*. Anhand der 16S-rRNA-Gensequenzanalysen wurde dieses Isolat auf Grund von ausgeprägter Sequenzhomologie den *Streptococcus mitis* Isolaten zugeordnet. Die Pathogenität und Ökologie dieser beiden Spezies zeigt jedoch deutliche Unterschiede. Daher wurde das *Streptococcus pneumoniae* Isolat R6 anhand der Analyse der extrazellulären Virulenzfaktoren durch

das entwickelte Microarraysystem der ersten Mitisuntergruppe zugeordnet, jedoch von den Oralstreptokokken dieser Untergruppe separiert. *Streptococcus mutans* gehört wegen seiner Persistenz in der menschlichen Mundhöhle zur Gruppe der Oralstreptokokken und wurde auch durch die 16S-rRNA-Gensequenzanalyse hierarchisch innerhalb der übrigen Oralstreptokokkenisolate dargestellt. Die Clusteranalyse der Microarraysignale separierte das *Streptococcus mutans* Isolat UA159 jedoch von den analysierten Oralstreptokokkenisolaten. Dies steht im Einklang mit der ökologischen Sonderstellung von *Streptococcus mutans* innerhalb der Oralstreptokokken. Durch seine ausgeprägte Azidogenität und Azidurie inhibiert *Streptococcus mutans* nicht nur effektiv das Wachstum anderer Oralstreptokokkenarten, sondern ist als Haupterreger der Zahnkaries die einzige Oralstreptokokkenspezies, die in der Mundhöhle des Menschen als Pathogen eingestuft werden muss.

Die Ergebnisse dieser Betrachtungen verdeutlichen, dass das entwickelte Microarraysystem eine neue Untersuchungsmethode zur kombinierten Analyse der phylogenetischen und ökologischen Beziehungen innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken darstellt. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse geben Anlass, die phylogenetische Einteilung innerhalb der Oralstreptokokken weitergehend zu überprüfen. Der Einfluss der Genausstattung des entwickelten Microarraysystems auf die Clusteranalyse darf jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden und bedarf weiterer Analysen.

Die Speziestypisierung und Analyse phylogenetischer Beziehungen zwischen verschiedenen Streptokokkenisolaten stellte ein Anwendungsgebiet des entwickelten DNS-Microarraysystems dar. Darüber hinaus sollte der speziesübergreifende Virulenzfaktormicroarray einen Überblick über Vorkommen und Verteilung von Genen virulenzrelevanter Proteine innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken ermöglichen, um Zusammenhänge zwischen der Präsenz bestimmter Virulenzfaktoren und der Pathogenität der analysierten Oralstreptokokkenisolate zu untersuchen. Dafür wurden die Signale der Gensonden des entwickelten Microarrays nach der Funktion des von den Genen codierten Proteins geordnet und betrachtet (4.2.3.2). Da bei der Pathogenese der Oralstreptokokken sowohl über die Persistenz der Bakterien im Blutstrom als auch über die Adhäsion und Kolonisierung von Gewebestrukturen wenig bekannt ist, wurde verstärkt nach antiphagozytischen Faktoren, Adhäsinen und Spreading-Faktoren gesucht.

Viele der Virulenzfaktoren aus der Gruppe der pyogenen Streptokokken, die für *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* sowie für Gruppe G- und C-Streptokokken beschrieben sind, konnten in den analysierten Oralstreptokokkenisolaten nicht nachgewiesen werden. Signale für spezifische Adhäsine aus der pyogenen Gruppe, die mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Fibronektin, Kollagen oder Laminin interagieren und so die Bindung an Gewebestrukturen vermitteln, wurden in den analysierten Isolaten nur sehr vereinzelt detektiert. Selbst die für einige Oralstreptokokken beschriebenen Adhäsine für Extrazellulärmatrixproteine

(FbpA, CshA, SspA, SspB) konnten vergleichsweise selten nachgewiesen werden. Dies deutet entweder auf einen geringen Konservierungsgrad oder eine eingeschränkte Verteilung der Adhäsingene hin. Die spezifische Adhäsion an Thromben auf vorgeschädigtem Herzklappengewebe, stellt für einige Arten aus der Gruppe der Oralstreptokokken einen wichtigen Virulenzfaktor bei der Pathogenese der infektiösen Endokarditis dar und wird auch als antiphagozytischer Mechanismus diskutiert (Herzberg, 1996). Solche Mechanismen sind bisher jedoch nur für einige Oralstreptokokkenarten beschrieben und die Verbreitung bedeutender Faktoren (PAAP, pblA, pblB) konnte auf Grund fehlender Sequenzinformationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Anhand von Abbildung 4.2.3.4 wurden jedoch Gene von Thrombozytenenadhäsinen aus *Streptococcus gordonii* (hsa) und *Streptococcus sanguinis* (ssab) bei nahezu allen analysierten Oralstreptokokkenarten nachgewiesen. Ein signifikanter Einfluss von SsaB in der Pathogenese von Oralstreptokokkeninfektionen konnte erst kürzlich im Tiermodell gezeigt werden (Das *et al.*, 2009). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen eine spezieübergreifende Verteilung dieser beiden Faktoren und deuten darauf hin, dass die Thrombozytenadhäsion unter den Oralstreptokokken ein weit verbreiteter Virulenzmechanismus ist. Die Tatsache, dass diese beiden Virulenzfaktoren (Hsa, SsaB) eine Doppelfunktion als Adhäsine in der Mundhöhle und auch im Blutstrom aufweisen, ist ein eindrucksvoller Beweis für die Anpassungsfähigkeit dieser Organismengruppe. Oberflächenproteine obligat pathogener Streptokokken, deren Funktion ausschließlich die Bindung an Gewebsstrukturen ist, wurden bei den analysierten Oralstreptokokken nur selten nachgewiesen. Dies weist darauf hin, dass solche Adhäsine für die kommensalen Bakterien in ihrem natürlichen Lebensraum von geringem Nutzen sind. Selbst für die wenigen gewebspezifischen Adhäsine aus Oralstreptokokken konnte bisher immer auch eine Funktion in ihrem natürlichen Lebensraum, der Mundhöhle, aufgezeigt werden (2.2.1).

Viele der bedeutenden antiphagozytischen Faktoren aus pathogenen Streptokokken der pyogenen Gruppe, die für den Microarray ausgewählt wurden, ließen sich in den analysierten Oralstreptokokkenisolaten nicht nachweisen. Weder Gensonden von Proteinen, die Fibrinogen als Schutz vor Phagozytose auf der Bakterienoberfläche binden, noch Gensonden immunglobulinbindender Proteine oder Superantigene erzeugten in der Analyse der Oralstreptokokkenarten positive Signale. Die Microarrayanalysen gaben jedoch Hinweise auf die Präsenz von zwei Genen bakterieller Komplementfaktorproteasen (*cspA*, *scpB*) in den analysierten Oralstreptokokkenisolaten. Sezernierte Komplementfaktorproteasen können durch proteolytische Prozessierung der Schlüsselfaktoren des Komplementsystems der Opsonisierung und der effektiven Phagozytose der Bakterien durch Zellen des Immunsystems entgegenwirken. Zudem erzeugten in einigen Isolaten Sonden für Hämolysine positive Signale, die ebenfalls einen aktiven Abwehrmechanismus gegen phagozytische Zellen des Immunsystems darstellen.

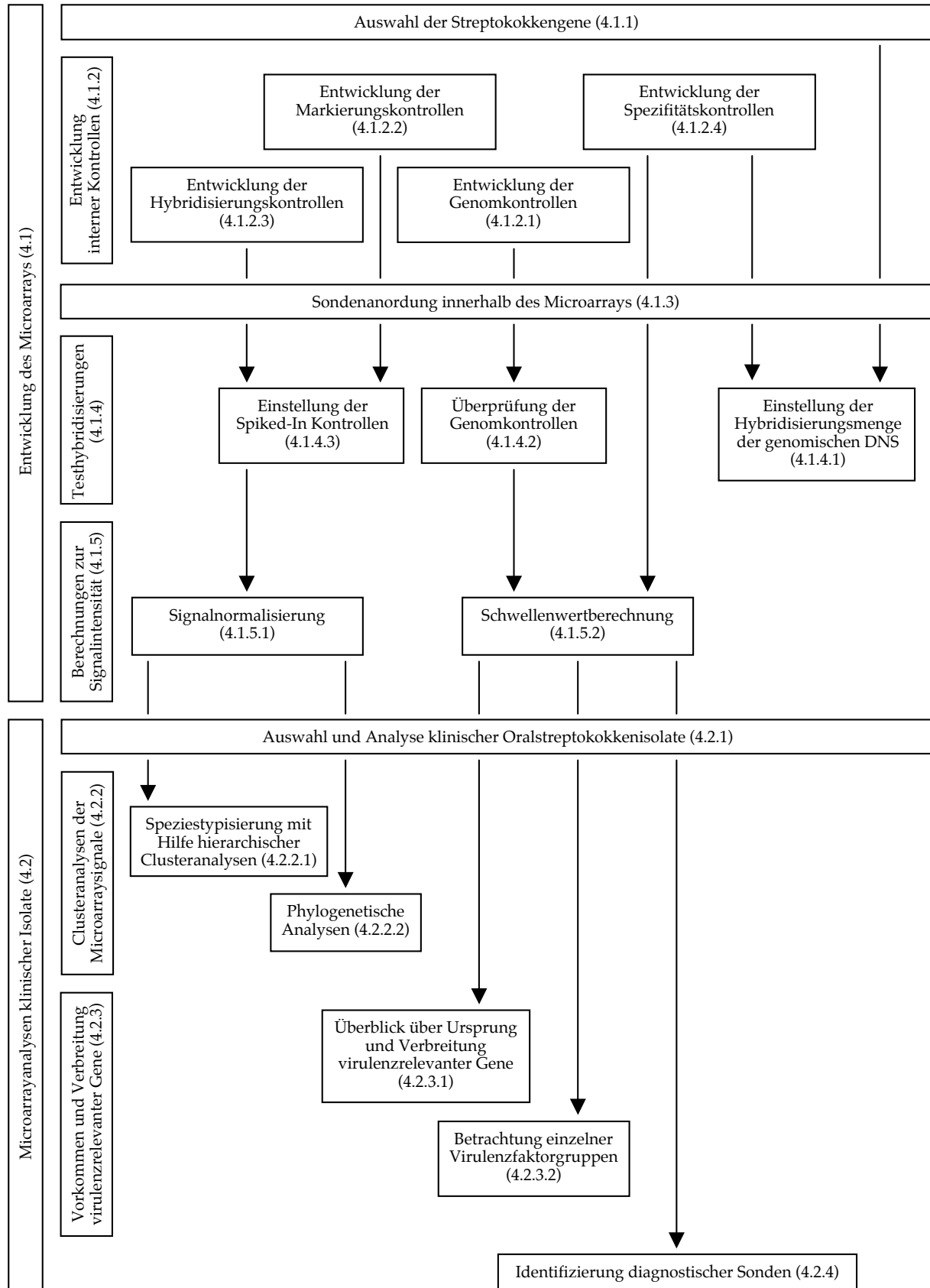
Oralstreptokokken besitzen nicht die hocheffektiven Mechanismen zur Plasminogenaktivierung (Streptokinasen), die bei obligat pathogenen Streptokokken für effiziente Dissemination und dramatische Gewebedegradation verantwortlich sind. Dennoch konnten anhand der Microarrayergebnisse Hinweise auf die Präsenz extrazellulärer gewebedegradierender Enzyme und anderer Spreading-Faktoren in den analysierten Oralstreptokokkenisolaten gewonnen werden. Mehrere Gene extrazellulärer Hyaluronidasen und Proteasen, darunter auch Kollagenasen, wurden bei den analysierten Isolaten nachgewiesen. Der anzunehmende Einfluss dieser Faktoren auf die Pathogenese der Oralstreptokokken muss in weiterführenden Analysen geklärt werden.

Der entwickelte speziesübergreifende Virulenzfaktormicroarray war anhand der Analysen klinischer Isolate nicht nur in der Lage, sein Potential als Spezies-typisierungsmethode unter Beweis zu stellen und neue Einblicke in die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gruppe der Oralstreptokokken zu liefern, sondern konnte auch Hinweise auf eine Reihe von Virulenzfaktoren in Oralstreptokokken geben, die voraussichtlich wichtige Beiträge zum pathogenen Potential dieser Organismengruppe leisten und daher weiterführende molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen motivieren.



# 6 Anhang

## 6.1 Projektübersicht



**Abbildung 6.1 (vorherige Seite): Projektübersicht.** Dargestellt ist ein Flussdiagramm zur Einordnung der einzelnen Schritte der Entwicklung (4.1) und Anwendung (4.2) des spezieübergreifenden Virulenzfaktormicroarrays

## 6.2 Programme und Datenbanken

**SignalP 3.0** Center for Biological Sequence Analysis

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

**SOSUI/G 1.1** Mitaku Group

<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuiG/sosuigsubmit.html>

**blastn** National Center for Biotechnology Information

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

**Genomdatenbank** National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2&type=0&name=Complete%20Bacteria>

**Nukleinsäuredatenbank** National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

**Proteindatenbank** National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>

## 6.3 Literaturverzeichnis

### 6.3.1 Fachbücher

**Hakenbeck R., Chhatwal G.S.** Molecular Biology of Streptococci. Horizon Scientific Press, 2007 ISBN 1904933327, 9781904933328

**Knudsen S.** Guide to Analysis of DNA Microarray Data. John Wiley & Sons 2004, ISBN 0471656046

**Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock** Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2002, ISBN 3827405661

**Sanderink R.B.A., Bernhardt H., Knoke M., Meyer J., Weber C., Weiger R.** Orale Mikrobiologie und Immunologie. Quintessenz Verlags-GmbH, 2004 ISBN 3876524431

### 6.3.2 Methodenliteratur

**BioPrime® DNA Labeling System.** Invitrogen

<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/18094011.pdf>

**Dneasy® Blood & Tissue Handbook.** Qiagen

[http://www1.qiagen.com/HB/DNeasyBloodTissueKit\\_EN](http://www1.qiagen.com/HB/DNeasyBloodTissueKit_EN)

**Instructions CodeLink Gene Expression System.** GE Healthcare

[http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/62C69113DE4C4445C1256EB400418046/\\$file/63005460.pdf](http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/62C69113DE4C4445C1256EB400418046/$file/63005460.pdf)

**QIAquick Spin Handbook.** Qiagen

[http://www1.qiagen.com/HB/QIAquickGelExtractionKit\\_EN](http://www1.qiagen.com/HB/QIAquickGelExtractionKit_EN)

**User Guide CodeLink Activated Slides.** GE Healthcare

[http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/39E6F9A19AE4D39BC1256EB400418033/\\$file/080064RevAB.pdf](http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/39E6F9A19AE4D39BC1256EB400418033/$file/080064RevAB.pdf)

**User Guide SlideBooster™ SB800.** Advalytix

[http://www.advalytix.com/images/downloads/SB800-Manual.3.0\\_s.pdf](http://www.advalytix.com/images/downloads/SB800-Manual.3.0_s.pdf)

### 6.3.3 Artikel aus Fachzeitschriften

Ajdić D., McShan W.M., McLaughlin R.E., Savić G., Chang J., Carson M.B., Primeaux C., Tian R., Kenton S., Jia H., Lin S., Qian Y., Li S., Zhu H., Najjar F., Lai H., White J., Roe B.A., Ferretti J.J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Oct 29;99(22):14434-9.

Allen B.L., Höök M. Isolation of a putative laminin binding protein from *Streptococcus anginosus*. *Microb Pathog*. **2002** Jul;33(1):23-31.

Angel C.S., Ruzek M., Hostetter M.K. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. **1994** Sep;170(3):600-8.

Bahrani-Mougeot F.K., Paster B.J., Coleman S., Ashar J., Barbuto S., Lockhart P.B. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol*. **2008** Jun;46(6):2129-32.

Barrau K., Boulamery A., Imbert G., Casalta J.P., Habib G., Messana T., Bonnet J.L., Rubinstein E., Raoult D. Causative organisms of infective endocarditis according to host status. *Clin Microbiol Infect*. **2004** Apr;10(4):302-8.

- Beighton D.** The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* **2005** Aug;33(4):248-55. Review.
- Bender G.R., Thibodeau E.A., Marquis R.E.** Reduction of acidurance of streptococcal growth and glycolysis by fluoride and gramicidin. *J Dent Res.* **1985** Feb;64(2):90-5.
- Bensing B.A., López J.A., Sullam P.M.** The *Streptococcus gordonii* surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalpha. *Infect Immun.* **2004** Nov;72(11):6528-37.
- Beres S.B., Sylva G.L., Barbian K.D., Lei B., Hoff J.S., Mammarella N.D., Liu M.Y., Smoot J.C., Porcella S.F., Parkins L.D., Campbell D.S., Smith T.M., McCormick J.K., Leung D.Y., Schlievert P.M., Musser J.M.** Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002** Jul 23;99(15):10078-83.
- Björck L., Kronvall G.** Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol.* **1984** Aug;133(2):969-74.
- Brown A.E., Rogers J.D., Haase E.M., Zelasko P.M., Scannapieco F.A.** Prevalence of the amylase-binding protein A gene (abpA) in oral streptococci. *J Clin Microbiol.* **1999** Dec;37(12):4081-5.
- Burnette-Curley D., Wells V., Viscount H., Munro C.L., Fenno J.C., Fives-Taylor P., Macrina F.L.** FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis* endocarditis. *Infect Immun.* **1995** Dec;63(12):4669-74.
- Chen S.H., Yang C.P., Chiu C.H., Chia J.H., Huang I.A., Jaing T.H.** Fulminant septicaemia caused by multi-drug-resistant *Streptococcus mitis* following unrelated cord blood transplantation. *Ann Trop Paediatr.* **2006** Sep;26(3):247-9.
- Christie J., McNab R., Jenkinson H.F.** Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology.* **2002** Jun;148(Pt 6):1615-25.
- Cleary P.P., Prahbu U., Dale J.B., Wexler D.E., Handley J.** Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infect Immun.* **1992** Dec;60(12):5219-23.
- Cleary P.P., Handley J., Suvorov A.N., Podbielski A., Ferrieri P.** Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes. *Infect Immun.* **1992** Oct;60(10):4239-44.

**Cogulu D., Uzel A., Oncag O., Eronat C.** PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2008** Sep;106(3):443-9.

**Cole M.F., Evans M., Fitzsimmons S., Johnson J., Pearce C., Sheridan M.J., Wientzen R., Bowden G.** Pioneer oral streptococci produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun.* **1994** Jun;62(6):2165-8.

**Collin M., Olsén A.** Extracellular enzymes with immunomodulating activities: variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* **2003** Jun;71(6):2983-92. Review.

**Cunningham M.W.** Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* **2000** Jul;13(3):470-511. Review.

**Das S., Kanamoto T., Ge X., Xu P., Unoki T., Munro C.L., Kitten T.** Contribution of lipoproteins and lipoprotein processing to endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol.* **2009** Apr 24.

**Douglas C.W., Brown P.R., Preston F.E.** Platelet aggregation by oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett.* **1990** Oct;60(1-2):63-7.

**Douglas C.W., Heath J., Hampton K.K., Preston F.E.** Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol.* **1993** Sep;39(3):179-82.

**Erickson P.R., Herzberg M.C.** A collagen-like immunodeterminant on the surface of *Streptococcus sanguis* induces platelet aggregation. *J Immunol.* **1987** May 15;138(10):3360-6.

**Erickson P.R., Herzberg M.C.** Purification and partial characterization of a 65-kDa platelet aggregation-associated protein antigen from the surface of *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem.* **1990** Aug 25;265(24):14080-7.

**Erickson P.R., Herzberg M.C.** The *Streptococcus sanguis* platelet aggregation-associated protein. Identification and characterization of the minimal platelet-interactive domain. *J Biol Chem.* **1993** Jan 25;268(3):1646-9.

**Erickson P.R., Herzberg M.C.** Altered expression of the platelet aggregation-associated protein from *Streptococcus sanguis* after growth in the presence of collagen. *Infect Immun.* **1995** Mar;63(3):1084-8.

**Friedrichs C., Rodloff A.C., Chhatwal G.S., Schellenberger W., Eschrich K.** Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol.* **2007** Aug;45(8):2392-7.

**Ganeshkumar N., Hannam P.M., Kolenbrander P.E., McBride B.C.** Nucleotide sequence of a gene coding for a saliva-binding protein (SsaB) from *Streptococcus sanguis* 12 and possible role of the protein in coaggregation with actinomyces. *Infect Immun.* **1991** Mar;59(3):1093-9.

**Goldmann O., Sastalla I., Wos-Oxley M., Rohde M., Medina E.** *Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway. *Cell Microbiol.* **2009** Jan;11(1):138-55.

**Hakenbeck R., Balmelle N., Weber B., Gardès C., Keck W., de Saizieu A.** Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **2001** Apr;69(4):2477-86.

**von Heijne G.** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **1986** Jun 11;14(11):4683-90.

**Herzberg M.C., MacFarlane G.D., Gong K., Armstrong N.N., Witt A.R., Erickson P.R., Meyer M.W.** The platelet interactivity phenotype of *Streptococcus sanguis* influences the course of experimental endocarditis. *Infect Immun.* **1992** Nov;60(11):4809-18.

**Herzberg M.C.** Platelet-streptococcal interactions in endocarditis. *Crit Rev Oral Biol Med.* **1996**;7(3):222-36. Review.

**Hidalgo-Grass C., Mishalian I., Dan-Goor M., Belotserkovsky I., Eran Y., Nizet V., Peled A., Hanski E.** A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *EMBO J.* **2006** Oct 4;25(19):4628-37.

**Hoshino T., Fujiwara T., Kilian M.** Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol.* **2005** Dec;43(12):6073-85.

**Hoskins J., Alborn W.E. Jr., Arnold J., Blaszcak L.C., Burgett S., DeHoff B.S., Estrem S.T., Fritz L., Fu D.J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J.S., Khoja H., Kraft A.R., Lagace R.E., LeBlanc D.J., Lee L.N., Lefkowitz E.J., Lu J., Matsushima P., McAhren S.M., McHenney M., McLeaster K., Mundy C.W., Nicas T.I., Norris F.H., O'Gara M., Peery R.B., Robertson G.T., Rockey P., Sun P.M., Winkler M.E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C.A., Baltz R.H., Jaskunas S.R., Rosteck P.R. Jr., Skatrud P.L., Glass J.I.** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* **2001** Oct;183(19):5709-17.

**Iga K., Hori K., Matsumura T., Tomonaga G., Gen H., Tamamura T.** Native valve infective endocarditis in adults--analysis of 32 consecutive cases over a ten-year period from 1980 to 1989. *Jpn Circ J.* **1991** May;55(5):437-42.

**Jakubovics N.S., Strömberg N., van Dolleweerd C.J., Kelly C.G., Jenkinson H.F.** Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. *Mol Microbiol.* **2005** Mar;55(5):1591-605.

**Jedrzejewski M.J.** Extracellular virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci.* **2004** Jan 1;9:891-914. Review.

**Jefferson K.K.** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* **2004** Jul 15;236(2):163-73. Review.

**Johansson H.M., Mörgelin M., Frick I.M.** Protein FOG-a streptococcal inhibitor of neutrophil function. *Microbiology.* **2004** Dec;150(Pt 12):4211-21.

**Jonsson H., Frykberg L., Rantamäki L., Guss B.** MAG, a novel plasma protein receptor from *Streptococcus dysgalactiae*. *Gene.* **1994** May 27;143(1):85-9.

**Kawamura Y., Hou X.G., Sultana F., Miura H., Ezaki T.** Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* **1995** Apr;45(2):406-8.

**Kilian M., Poulsen K., Blomqvist T., Håvarstein L.S., Bek-Thomsen M., Tettelin H., Sørensen U.B.** Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS ONE.* **2008** Jul 16;3(7):e2683.

**Kline J.B., Xu S., Bisno A.L., Collins C.M.** Identification of a fibronectin-binding protein (GfbA) in pathogenic group G streptococci. *Infect Immun.* **1996** Jun;64(6):2122-9.

**Kreikemeyer B., Nakata M., Oehmcke S., Gschwendtner C., Normann J., Podbielski A.** *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological functions, and potential clinical impact. *J Biol Chem.* **2005** Sep 30;280(39):33228-39.

**Lähteenmäki K., Kuusela P., Korhonen T.K.** Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev.* **2001** Dec;25(5):531-52. Review.

**Lick S.D., Edozie S.N., Woodside K.J., Conti V.R.** *Streptococcus viridans* endocarditis from tongue piercing. *J Emerg Med.* **2005** Jul;29(1):57-9.

**Lindgren P.E., Signäs C., Rantamäki L., Lindberg M.** A fibronectin-binding protein from *Streptococcus equisimilis*: characterization of the gene and identification of the binding domain. *Vet Microbiol.* **1994** Aug 1;41(3):235-47.

**Lindmark H., Jacobsson K., Frykberg L., Guss B.** Fibronectin-binding protein of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Infect Immun.* **1996** Oct;64(10):3993-9.

- Liu G.Y., Nizet V.** Extracellular virulence factors of group B Streptococci. *Front Biosci.* **2004** May 1;9:1794-802. Review.
- Lombardi A., Coppola M., Pennica A., Maglio R., Moscaroli A., Lo Russo M., Provenza G.** Splenic abscess due to *Streptococcus anginosus*. Case report. *G Chir.* **2008** Aug-Sep;29(8-9):359-61.
- Love R.M., McMillan M.D., Jenkinson H.F.** Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun.* **1997** Dec;65(12):5157-64.
- Lu H.Z., Weng X.H., Zhu B., Li H., Yin Y.K., Zhang Y.X., Haas D.W., Tang Y.W.** Major outbreak of toxic shock-like syndrome caused by *Streptococcus mitis*. *J Clin Microbiol.* **2003** Jul;41(7):3051-5.
- Lucas V.S., Gafan G., Dewhurst S., Roberts G.J.** Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. *J Dent.* **2008** Jul;36(7):481-7.
- Ma J.K., Kelly C.G., Munro G., Whiley R.A., Lehner T.** Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci. *Infect Immun.* **1991** Aug;59(8):2686-94.
- Martínez Odriozola P., Muñoz Sánchez J., Arriola Martínez P., Lizarralde Palacios E., Santamaría Jáuregui J.M., Zuazo Meabe J., Cisterna Cáncer R., de la Villa F.M.** Enterococcal infective endocarditis: description of 12 cases. *An Med Interna.* **2007** Nov;24(11):539-42.
- Matsumura M., Izumi T., Matsumoto M., Tsuji M., Fujiwara T., Ooshima T.** The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol.* **2003**;47(3):213-5.
- McNab R., Holmes A.R., Clarke J.M., Tannock G.W., Jenkinson H.F.** Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. *Infect Immun.* **1996** Oct;64(10):4204-10.
- Meyer M.W., Witt A.R., Krishnan L.K., Yokota M., Roszkowski M.J., Rudney J.D., Herzberg M.C.** Therapeutic advantage of recombinant human plasminogen activator in endocarditis: evidence from experiments in rabbits. *Thromb Haemost.* **1995** Apr;73(4):680-2.
- Molinari G., Talay S.R., Valentin-Weigand P., Rohde M., Chhatwal G.S.** The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.* **1997** Apr;65(4):1357-63.



**Nitsche-Schmitz D.P., Johansson H.M., Sastalla I., Reissmann S., Frick I.M., Chhatwal G.S.** Group G streptococcal IgG binding molecules FOG and protein G have different impacts on opsonization by C1q. *J Biol Chem.* **2007** Jun 15;282(24):17530-6.

**Nyvad B., Kilian M.** Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* **1990**;24(4):267-72.

**Petersen F.C., Assev S., van der Mei H.C., Busscher H.J., Scheie A.A.** Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun.* **2002** Jan;70(1):249-56.

**Petersen F.C., Tao L., Scheie A.A.** DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol.* **2005** Jul;187(13):4392-400.

**Proft T., Fraser J.D.** Streptococcal superantigens. *Chem Immunol Allergy.* **2007**;93:1-23. Review

**Rocha C.L., Fischetti V.A.** Identification and characterization of a new protein from *Streptococcus pyogenes* having homology with fibronectin and fibrinogen binding proteins. *Adv Exp Med Biol.* **1997**;418:737-9.

**Rölla G., Ciardi J.E., Schultz S.A.** Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite. Possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. *Scand J Dent Res.* **1983** Apr;91(2):112-7.

**Russell M.W., Wu H.Y., White P.L., Kilian M., Henrichsen J.** Serum antibody responses to *Streptococcus mutans* antigens in humans systemically infected with oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* **1992** Dec;7(6):321-5.

**Sato Y., Okamoto K., Kagami A., Yamamoto Y., Igarashi T., Kizaki H.** *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J Dent Res.* **2004** Jul;83(7):534-9.

**de Soet J.J., Nyvad B., Kilian M.** Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res.* **2000** Nov-Dec;34(6):486-90.

**Soldado L., Esteban F., Delgado-Rodríguez M., Solanellas J., Florez C., Martín E.** Bacteraemia during tonsillectomy: a study of the factors involved and clinical implications. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* **1998** Feb;23(1):63-6.

**Sommer P., Gleyzal C., Guerret S., Etienne J., Grimaud J.A.** Induction of a putative laminin-binding protein of *Streptococcus gordonii* in human infective endocarditis. *Infect Immun.* **1992** Feb;60(2):360-5.

**Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S., Weber-Heynemann J., Schnitzler N., Lütticken R., Podbielski A.** Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun.* **1999** Feb;67(2):871-8.

**Starr C.R., Engleberg N.C.** Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus. *Infect Immun.* **2006** Jan;74(1):40-8.

**Tagg J.R.** Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J Med Res.* **2004** May;119 Suppl:13-6.

**Takahashi Y., Konishi K., Cisar J.O., Yoshikawa M.** Identification and characterization of hsa, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun.* **2002** Mar;70(3):1209-18.

**Takahashi Y., Yajima A., Cisar J.O., Konishi K.** Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. *Infect Immun.* **2004** Jul;72(7):3876-82.

**Tettelin H., Massignani V., Cieslewicz M.J., Donati C., Medini D., Ward N.L., Angiuoli S.V., Crabtree J., Jones A.L., Durkin A.S., Deboy R.T., Davidsen T.M., Mora M., Scarselli M., Margarit y Ros I., Peterson J.D., Hauser C.R., Sundaram J.P., Nelson W.C., Madupu R., Brinkac L.M., Dodson R.J., Rosovitz M.J., Sullivan S.A., Daugherty S.C., Haft D.H., Selengut J., Gwinn M.L., Zhou L., Zafar N., Khouri H., Radune D., Dimitrov G., Watkins K., O'Connor K.J., Smith S., Utterback T.R., White O., Rubens C.E., Grandi G., Madoff L.C., Kasper D.L., Telford J.L., Wessels M.R., Rappuoli R., Fraser C.M.** Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005** Sep 27;102(39):13950-5.

**Timmer A.M., Timmer J.C., Pence M.A., Hsu L.C., Ghochani M., Frey T.G., Karin M., Salvesen G.S., Nizet V.** Streptolysin O promotes group A Streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem.* **2009** Jan 9;284(2):862-71.

**Tomás I., Alvarez M., Limeres J., Potel C., Medina J., Diz P.** Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis.* **2007** Jan;13(1):56-62.

**Tyler B.M., Cole M.F.** Effect of IgA1 protease on the ability of secretory IgA1 antibodies to inhibit the adherence of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol.* **1998**;42(7):503-8.

**Ulivieri S., Oliveri G., Filosomi G.** Brain abscess following dental procedures. Case report. *Minerva Stomatol.* **2007** May;56(5):303-5.

**Vacca-Smith A.M., Bowen W.H.** Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol.* **1998** Feb;43(2):103-10.

**Vasi J., Svensson J., Frick I.M., Müller H.P.** Five homologous repeats of the protein G-related protein MIG cooperate in binding to goat immunoglobulin G. *Infect Immun.* **1999** Jan;67(1):413-6.

**Wagner K.W., Schön R., Schumacher M., Schmelzeisen R., Schulze D.** Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2006** Oct;102(4):e21-3.

**Westling K., Julander I., Ljungman P., Vondracek M., Wretling B., Jalal S.** Identification of species of viridans group streptococci in clinical blood culture isolates by sequence analysis of the RNase P RNA gene, rnpB.J *Infect.* **2008** Mar;56(3):204-10.

**Whitnack E., Beachey E.H.** Antiopsonic activity of fibrinogen bound to M protein on the surface of group A streptococci. *J Clin Invest.* **1982** Apr;69(4):1042-5.

**Willcox M.D., Zhu H., Knox K.W.** *Streptococcus australis* sp. nov., a novel oral streptococcus. *Int J Syst Evol Microbiol.* **2001** Jul;51(Pt 4):1277-81.

## 6.4 Stammsammlungsliste

Tabelle 6.4: Sammlung klinischer Oralstreptokokkenisolate.

Bezeichnung	PCR-Typisierung	API 20 Strep-Typisierung	Isolation	Datum
SV4	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Hornhautulkusabstrich	02.04.04
SV5	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	24.03.04
SV7	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	27.06.04
SV8	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Blutkultur	15.07.04
SV9	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	22.07.04
SV11	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	24.03.04
SV12	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabszess	02.07.04
SV13	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abszessmaterial	01.04.04
SV14	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Hornhautulkusabstrich	02.04.04
SV15	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	06.04.04
SV16	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	13.04.04
SV18	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	02.05.04
SV19*	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Punktat	21.05.04
SV20	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Wundabszess	22.05.04
SV21	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	13.06.04
SV22*	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	12.03.04
SV23	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	14.03.04
SV24	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abstrich	31.03.04
SV25*	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Oberlippenpunktat	31.03.04
SV26*	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabszess	19.03.04
SV27*	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	01.07.04
SV28	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	11.08.04
SV29*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	09.08.04

## 6 Anhang

Bezeichnung	PCR-Typisierung	API 20 Strep-Typisierung	Isolation	Datum
SV30*	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	09.08.04
SV31*	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial	17.06.04
SV32*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Abszessmaterial	09.08.04
SV33	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Pleurapunktat	07.09.04
SV34*	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abstrich	28.09.04
SV35*	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Abstrich	28.09.04
SV36*	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	24.09.04
SV37*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Abszessmaterial	24.09.04
SV41*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abstrich	07.10.04
SV42*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Abstrich	07.10.04
SV46*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Wundabszess	19.03.04
SV47	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	15.06.04
SV48*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Abszessmaterial	02.08.04
SV49	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Tonsillenabstrich	06.10.04
SV50	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Drainagespitze	28.10.04
SV51	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	05.11.04
SV52*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Abszessmaterial	04.11.04
SV53	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	05.11.04
SV54	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	06.11.04
SV55	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	25.10.04
SV56	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	25.10.04
SV57	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abstrich	15.09.04
SV58*	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abstrich Cavum uteri	27.10.04
SV59	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Lungenpunktat	12.11.04
SV60	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Fistelabstrich	09.01.05
SV61*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Fistelabstrich	19.11.04
SV62	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	07.11.04
SV63	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Pankreaspseudozyste	15.01.05
SV64	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Halsabstrich	18.11.04
SV65	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	17.12.04
SV66	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur	28.12.04
SV67	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	15.01.05
SV68	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Abszessmaterial	17.01.05
SV69*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	Blutkultur	15.01.05
SV70	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Punktat	23.12.04
SV71*	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abstrich	11.01.05
SV72	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	Ascites	23.02.05
SV73*	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabstrich	04.03.05
SV74	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Milzabszess	19.02.05
SV75	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Fistelabstrich	21.03.05
SV76	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	01.03.05
SV77*	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abszessmaterial	03.03.05
SV79*	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Blutkultur	04.03.05
SV80	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabstrich	14.03.05
SV81	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial	15.03.05
SV82	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	VKS	15.03.05
SV83*	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabstrich	22.03.05
SV84*	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur	09.03.05
SV85	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	Ascites	16.03.05
SV86*	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abszessmaterial	20.03.05
SV87*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Abstrich	01.04.05
SV91	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus equi</i>	Punktat	28.11.05
SV92	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur	17.06.05
SV93	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur	26.02.06
SV94*	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial	11.04.05
SV95	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abstrich	06.06.05
SV96*	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	24.01.06
SV97	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	27.03.06
SV98	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Blutkultur	07.07.06
SV99	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Abszessmaterial	14.07.06

## 6 Anhang

Bezeichnung	PCR-Typisierung	API 20 Strep-Typisierung	Isolation	Datum
SV100*	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Abszessmaterial	23.04.05
SV101	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	Blutkultur	29.04.05
SV102	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Ohrmuschelabszess	14.10.05
SV103	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Blutkultur	14.10.05
SV104	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Peritonsillarabszess	06.12.05
SV105	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	Blutkultur	26.05.06
SV106	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	26.05.06
SV107*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	Blutkultur	05.07.05
SV108*	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	Blutkultur	09.10.05
SV109	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	18.10.05
SV110	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	Ascites	23.04.06
SV111*	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Ohrabstrich	15.11.05
SV112*	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabstrich	29.04.05
SV113*	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabstrich	06.06.05
SV114	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Zahnleistenpunktat	14.08.05
SV115	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	10.01.06
SV116	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	06.06.05
SV117	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	03.03.06
SV118	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	Abszessmaterial	09.04.06
SV119	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	Blutkultur	12.05.06
SV120	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Blutkultur	13.07.06
SV121	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Blutkultur	08.07.05
SV122	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Wangenabszess	03.12.05
SV123	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Blutkultur	10.12.05
SV124*	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial	07.02.06
SV125	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	02.07.06
SV126	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abszessmaterial	29.04.05
SV127	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabstrich	20.05.05
SV128	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Pankreaszyste	12.08.05
SV129	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Wundabstrich	13.12.05
SV130	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Abszessmaterial	16.02.06
SV131	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Wundabstrich	15.03.06
SV132	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Drainagespitze	19.03.06
SV133	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Abszessmaterial	25.04.06
SV134	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	Blutkultur	27.04.06
SV135	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Abszessmaterial	18.05.05

\* Die gekennzeichneten Isolate wurden zusammen mit anderen Bakterienarten isoliert und stellen somit keine Isolate aus Monoinfektionen dar.

## 6.5 Genliste

Tabelle 6.5: Gensonden des entwickelten DNS-Microarrays

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
5111	SMU.22	sagA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5112	SMU.33		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5113	SMU.71		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5114	SMU.78	fruA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5115	SMU.79	fruB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5116	SMU.133c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5117	SMU.160		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5118	SMU.178		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5119	SMU.182	sloA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5120	SMU.184	sloC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5121	SMU.220c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5122	SMU.244	uppP	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5123	SMU.252		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
5124	SMU.253	dacA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5125	SMU.255	oppA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5126	SMU.259	oppF	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5127	SMU.287		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5128	SMU.299c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5129	SMU.318		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5130	SMU.360	gapC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5131	SMU.448		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5132	SMU.455	pbp2x	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5133	SMU.467	pbp1a	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5134	SMU.474	luxS	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5135	SMU.475		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5136	SMU.503c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5137	SMU.510c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5138	SMU.515		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5139	SMU.540	dpr	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5140	SMU.562	clpE	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5141	SMU.569	feoA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5142	SMU.570	feoB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5143	SMU.583		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5144	SMU.588		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5145	SMU.591c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5146	SMU.597	pbp2b	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5147	SMU.610	spaP	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5148	SMU.629	sod	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5149	SMU.630		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5150	SMU.651c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5151	SMU.654	mutF	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5152	SMU.655	mutE1	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5153	SMU.656	mutE2	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5154	SMU.657	mutG	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5155	SMU.690		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5156	SMU.704c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5157	SMU.707c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5158	SMU.711		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5159	SMU.745	lmrB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5160	SMU.759		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5161	SMU.761		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5162	SMU.764	ahpC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5163	SMU.765		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5164	SMU.771c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5165	SMU.772	gbpD	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5166	SMU.814	mutT	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5167	SMU.830	rgpF	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5168	SMU.843		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5169	SMU.862		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5170	SMU.879	msmF	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5171	SMU.880	msmG	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5172	SMU.882	msmK	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5173	SMU.883	dexB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5174	SMU.889	pbpX	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5175	SMU.924	tpx	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5176	SMU.940c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5177	SMU.949	clpX	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5178	SMU.956	clp	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5179	SMU.963c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5180	SMU.981	bglB1	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5181	SMU.982	bglB2	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5182	SMU.985	bglA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5183	SMU.1004	gtfB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
5184	SMU.1005	gtfC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5185	SMU.1071c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5186	SMU.1113	srtA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5187	SMU.1118c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5188	SMU.1119c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5189	SMU.1120		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5190	SMU.1131c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5191	SMU.1143c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5192	SMU.1148		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5193	SMU.1149		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5194	SMU.1150		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5195	SMU.1153c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5196	SMU.1249c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5197	SMU.1286c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5198	SMU.1302	adcA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5199	SMU.1338c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5200	SMU.1339	bacD	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5201	SMU.1340	bacA2	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5202	SMU.1341c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5203	SMU.1342	bacA1	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5204	SMU.1391c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5205	SMU.1396	gbpC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5206	SMU.1427c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5207	SMU.1438c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5208	SMU.1442c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5209	SMU.1449		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5210	SMU.1524c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5211	SMU.1568	malX	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5212	SMU.1569	malF	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5213	SMU.1584c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5214	SMU.1605		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5215	SMU.1606	smpB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5216	SMU.1611c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5217	SMU.1646c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5218	SMU.1672	clpP	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5219	SMU.1693	hlyX	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5220	SMU.1706		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5221	SMU.1788c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5222	SMU.1804c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5223	SMU.1809	scnG	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5224	SMU.1810	scnE	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5225	SMU.1811	scnF	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5226	SMU.1877	ptnA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5227	SMU.1878	ptnC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5228	SMU.1904c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5229	SMU.1905c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5230	SMU.1913c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5231	SMU.1928	psaB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5232	SMU.1929	htpX	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5233	SMU.1949	pbp2a	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5234	SMU.1958c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5235	SMU.1960c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5236	SMU.1961c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5237	SMU.1980c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5238	SMU.1981c		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5239	SMU.1991	pbp1b	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5240	SMU.2029	clpC	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5241	SMU.2035		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5242	SMU.2063	hemZ	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5243	SMU.2109		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
5244	SMU.2112	gbpA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5245	SMU.2164	htrA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5246	spr0008		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5247	spr0057	strH	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5248	spr0075		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5249	spr0092	capD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5250	spr0096		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5251	spr0108		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5252	spr0121	pspA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5253	spr0131	gcp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5254	spr0156		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5255	spr0174		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5256	spr0229	PTS-EIIA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5257	spr0247	pulA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5258	spr0286	hysA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5259	spr0299		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5260	spr0304	pbpX	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5261	spr0311		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5262	spr0327	aliA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5263	spr0328		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5264	spr0329	pbpA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5265	spr0337	cbpF	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5266	spr0348		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5267	spr0350	cbpG	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5268	spr0351	pcpC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5269	spr0428		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5270	spr0440		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5271	spr0447	xerD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5272	spr0451		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5273	spr0474	pncP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5274	spr0534	glnH	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5275	spr0545	ABC-SBP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5276	spr0551	brnQ	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5277	spr0554		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5278	spr0561	prtA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5279	spr0565	bgaA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5280	spr0576		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5281	spr0577	msrA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5282	spr0581	zmpB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5283	spr0583		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5284	spr0586		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5285	spr0587		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5286	spr0596		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5287	spr0600		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5288	spr0615		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5289	spr0621	ABC-SBP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5290	spr0659	livJ	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5291	spr0674	sodA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5292	spr0693		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5293	spr0799		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5294	spr0831	lytD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5295	spr0856	celA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5296	spr0857	celB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5297	spr0868	flpA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5298	spr0884	prsA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5299	spr0890		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5300	spr0901		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5301	spr0903	ccdA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5302	spr0904		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5303	spr0905	yfnA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6



## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
5304	spr0906	lmb	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5305	spr0907	phtD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5306	spr0908	phtE	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5307	spr0931		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5308	spr0936	ABC-MSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5309	spr0973	ftsW	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5310	spr0975	ABC-SBP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5311	spr1036	eno	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5312	spr1042	iga	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5313	spr1140		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5314	spr1178		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5315	spr1251	glnH	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5316	spr1257	pstS	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5317	spr1267		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5318	spr1274	spsA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5319	spr1284		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5320	spr1304	cppA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5321	spr1333	pgdA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5322	spr1382	aliB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5323	spr1400		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5324	spr1403		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5325	spr1418		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5326	spr1428		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5327	spr1494	psaA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5328	spr1527	ABC-SBP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5329	spr1528	PTS-EII	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5330	spr1531	nanB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5331	spr1534	ABC-SBP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5332	spr1549		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5333	spr1584		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5334	spr1652		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5335	spr1697		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5336	spr1728		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5337	spr1764		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5338	spr1771	nisP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5339	spr1780	epuA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5340	spr1782		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5341	spr1861	cglD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5342	spr1875		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5343	spr1915		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5344	spr1925		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5345	spr1945	pcpA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5346	spr1961		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5347	spr1965		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5348	spr1995	pspC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5349	spr2003		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5350	spr2006	cbpD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5351	spr2021	gsp-781	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5352	spr2023	mreC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5353	spr2045	sphtra	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6
5354	SMU.01	dnaA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5355	SMU.120		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5356	SMU.650		<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5357	SMU.671	citZ	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5358	SMU.867	rimM	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5359	SMU.1114	gyrA	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5360	SMU.1115	ldh	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5361	SMU.1673	upp	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5362	SMU.2009	rpsE	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
5363	SMU.2157	guaB	<i>Streptococcus mutans</i>	UA159

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
5364	AF248236	psaA	<i>Streptococcus mitis</i>	NCTC 12261
5365	DQ004563	iga	<i>Streptococcus mitis</i>	SK564
5366	AB181235	aliA	<i>Streptococcus mitis</i>	J22
5367	AB181235	aliB	<i>Streptococcus mitis</i>	J22
5368	AB181234	dexB	<i>Streptococcus oralis</i>	
5369	AB106539	srtA	<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557
5370	AF248237	psaA	<i>Streptococcus oralis</i>	NCTC 11427
5371	S81768	spaA	<i>Streptococcus oralis</i>	NCTC 7864
5372	Y13224	iga	<i>Streptococcus oralis</i>	SK23
5373	AF100426	fap1	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	FW213
5374	M26130	fimA	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	FW213
5375	AJ272341	cpsH	<i>Streptococcus salivarius</i>	FI9186
5376	AJ272341	cpsD	<i>Streptococcus salivarius</i>	FI9186
5377	AJ272341	cpsC	<i>Streptococcus salivarius</i>	FI9186
5378	AJ272341	cpsB	<i>Streptococcus salivarius</i>	FI9186
5379	L08445	ftf	<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975
5380	AF353638	cspB	<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975
5381	AF353638	cspA	<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975
5382	AY072742	cshA	<i>Streptococcus sanguinis</i>	NCTC 10904
5383	M63481	ssaB	<i>Streptococcus sanguis</i>	12
5384	Y13461	iga	<i>Streptococcus sanguis</i>	SK85
5385	L11577	scaA	<i>Streptococcus gordonii</i>	PK488
5386	AF035817	abpA	<i>Streptococcus gordonii</i>	NCTC 7868
5387	AB029393	hsa	<i>Streptococcus gordonii</i>	DL1
5388	X65164	cshA	<i>Streptococcus gordonii</i>	
5389	X65164	fbpA	<i>Streptococcus gordonii</i>	
5390	U40025	sspA	<i>Streptococcus gordonii</i>	M5
5391	AF485860	emm	<i>Streptococcus anginosus</i>	NSRT24
5392	AF248235	psaA	<i>Streptococcus anginosus</i>	NCTC 10713
5393	AF385683		<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823
5394	AY686729	emm	<i>Streptococcus constellatus</i>	
5395	AF485859	emm	<i>Streptococcus constellatus</i>	NSRT23
5396	AF192470		<i>Streptococcus constellatus</i>	NCTC 10708
5397	AF385684		<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 27335
5398	AB045140	pas	<i>Streptococcus intermedius</i>	GAI-1157
5399	AB029317	ily	<i>Streptococcus intermedius</i>	UNS46
5400	AF157015	cylE	<i>Streptococcus agalactiae</i>	COH1
5401	AF157015	cylK	<i>Streptococcus agalactiae</i>	COH1
5402	U15050	hylB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3502
5403	AB028896	cpsIaR	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5404	AB028896	cpsIaA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5405	AB028896	neuA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5406	AB028896	bcat	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5407	AF163833	cpsA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	COH1
5408	AF163833	cpsE	<i>Streptococcus agalactiae</i>	COH1
5409	X72754		<i>Streptococcus agalactiae</i>	R268
5410	M97256	bca	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5411	U56908	scpB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	78-471
5412	AF485279	spb1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	874391
5413	U58333	rib	<i>Streptococcus agalactiae</i>	BM110
5414	AY069949	prfA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5415	AY069949	ponA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
5416	SAG0499		<i>Streptococcus agalactiae</i>	2603V/R
5417	AE014208	manL	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2603V/R
8728	A04926	skc	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8729	AB050249	slo	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	H46A
8730	AB051299	samhpaf	<i>Streptococcus mitis</i>	Nm-65
8731	AB095370	fnz2	<i>Streptococcus equi</i>	VTU211
8732	AB095371	fnz	<i>Streptococcus equi</i>	VTU211
8733	AB095373		<i>Streptococcus equi</i>	VTU211

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
8734	AB105077	spegg1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8735	AB217854	naplr	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	NDMC1
8736	AB271060	lcd	<i>Streptococcus intermedius</i>	
8737	AB326213	fimI	<i>Streptococcus intermedius</i>	1208-1
8738	AB326999	lcd	<i>Streptococcus anginosus</i>	IMU114
8739	AF009908	prtF15	<i>Streptococcus pyogenes</i>	EF1949
8740	AF023876		<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8741	AF091393	R28	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AL368
8742	AF104300	skc	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	89-272
8743	AF104301	skc	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	87-542-W
8744	AF128264	msrA	<i>Streptococcus gordonii</i>	CH1
8745	AF354648	abpB	<i>Streptococcus gordonii</i>	
8746	AF414053		<i>Streptococcus equi</i>	
8747	AF468692		<i>Streptococcus equi</i>	ATCC 35246
8748	AF519492		<i>Streptococcus equi</i>	SEZ0012177D
8749	AJ002290	pbp1a	<i>Streptococcus mitis</i>	B6
8750	AJ240617	xpt	<i>Streptococcus oralis</i>	11427
8751	AJ240618	xpt	<i>Streptococcus mitis</i>	12261
8752	AJ252191	lytA	<i>Streptococcus mitis</i>	COL15
8753	AJ300679	DRS	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AC-2353
8754	AJ319589	lmb	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	LMG 15845
8755	AJ557010	speM	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8756	AJ605745	gfbA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	NS3572
8757	AJ605760	gbfA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	59G
8758	AJ851826	szeM	<i>Streptococcus equi</i>	122
8759	AJ870429	lytB	<i>Streptococcus mitis</i>	NCTC 12261
8760	AY028382	secA	<i>Streptococcus gordonii</i>	M99
8761	AY033399_1873-2419	sagC	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	VASD1
8762	AY033399_375-900	sagA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	VASD1
8763	AY033399_926-1876	sagB	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	VASD1
8764	AY049745	speA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4951
8765	AY072743	cshB	<i>Streptococcus gordonii</i>	Challis DL1
8766	AY120874	SfbX	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
8767	AY289800	pbp2b	<i>Streptococcus constellatus</i>	MM9889a
8768	AY289801	pbp2b	<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 27336
8769	AY289802	pbp2b	<i>Streptococcus anginosus</i>	MAS625
8770	AY302595		<i>Streptococcus anginosus</i>	MAS624
8771	AY302596		<i>Streptococcus constellatus</i>	MM9889a
8772	AY907345	dysA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	W2580
8773	DQ217837	salA1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4003
8774	DQ363208	fnz-protein	<i>Streptococcus equi</i>	ATCC 35246
8775	DQ380235S1	alp	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8776	DQ380235S2	alp	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8777	DQ826037	ideZ	<i>Streptococcus equi</i>	ZV
8778	EF066519	mitilysin	<i>Streptococcus mitis</i>	R75I
8779	EF406087	sodA	<i>Streptococcus equi</i>	ATCC 43079
8780	EF989012		<i>Streptococcus mitis</i>	
8781	EMM_cs	emm	<i>Streptococcus sp.</i>	
8782	EU082206	hyl	<i>Streptococcus equi</i>	cvcc23362
8783	MOA_cs	moa	<i>Streptococcus anginosus</i>	SV52
8784	S46536	SKC-2	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 9542
8785	S85398	sarA	<i>Streptococcus gordonii</i>	
8786	SAK_0008	mfd	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8787	SAK_0050	pcsB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8788	SAK_0064	zooA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8789	SAK_0065	sip	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8790	SAK_0067		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8791	SAK_0083		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8792	SAK_0084		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8793	SAK_0137		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
8794	SAK_0143		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8795	SAK_0144		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8796	SAK_0158		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8797	SAK_0166	rbsB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8798	SAK_0175		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8799	SAK_0186	bag	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8800	SAK_0188		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8801	SAK_0192		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8802	SAK_0204		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8803	SAK_0205		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8804	SAK_0206		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8805	SAK_0220		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8806	SAK_0222		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8807	SAK_0228		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8808	SAK_0232		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8809	SAK_0242		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8810	SAK_0252		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8811	SAK_0301		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8812	SAK_0330		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8813	SAK_0337		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8814	SAK_0359	pbpX	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8815	SAK_0362		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8816	SAK_0370		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8817	SAK_0399		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8818	SAK_0442		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8819	SAK_0445		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8820	SAK_0457		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8821	SAK_0466		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8822	SAK_0478		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8823	SAK_0479	galU	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8824	SAK_0502		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8825	SAK_0517		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8826	SAK_0530		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8827	SAK_0532		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8828	SAK_0553		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8829	SAK_0556		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8830	SAK_0600	tlyA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8831	SAK_0604		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8832	SAK_0605		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8833	SAK_0652		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8834	SAK_0656		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8835	SAK_0672		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8836	SAK_0685	adcA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8837	SAK_0714		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8838	SAK_0722		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8839	SAK_0763		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8840	SAK_0768		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8841	SAK_0771		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8842	SAK_0776		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8843	SAK_0777		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8844	SAK_0778		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8845	SAK_0779		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8846	SAK_0780		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8847	SAK_0786		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8848	SAK_0803		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8849	SAK_0804		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8850	SAK_0807		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8851	SAK_0808		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8852	SAK_0809		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8853	SAK_0814		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
8854	SAK_0829		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8855	SAK_0840		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8856	SAK_0843		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8857	SAK_0848		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8858	SAK_0860		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8859	SAK_0865		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8860	SAK_0867		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8861	SAK_0868		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8862	SAK_0881		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8863	SAK_0890		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8864	SAK_0896		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8865	SAK_0901		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8866	SAK_0910		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8867	SAK_0913	sodA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8868	SAK_0920		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8869	SAK_0929	pepB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8870	SAK_0932	prsA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8871	SAK_0955		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8872	SAK_0956		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8873	SAK_0980	atpE	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8874	SAK_0990		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8875	SAK_0991	endA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8876	SAK_1009		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8877	SAK_1038	lepB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8878	SAK_1044		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8879	SAK_1049		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8880	SAK_1056		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8881	SAK_1058		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8882	SAK_1066		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8883	SAK_1068		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8884	SAK_1074		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8885	SAK_1079	ciaH	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8886	SAK_1087		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8887	SAK_1091	spxA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8888	SAK_1100	topA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8889	SAK_1102		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8890	SAK_1109		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8891	SAK_1114		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8892	SAK_1126		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8893	SAK_1142		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8894	SAK_1158		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8895	SAK_1193	potD	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8896	SAK_1206		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8897	SAK_1213		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8898	SAK_1225		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8899	SAK_1235		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8900	SAK_1252		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8901	SAK_1253		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8902	SAK_1254	cpsI	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8903	SAK_1255	cpsH	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8904	SAK_1256		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8905	SAK_1257	cpsF	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8906	SAK_1260	cpsC	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8907	SAK_1277	fbpA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8908	SAK_1284	hylB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8909	SAK_1293		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8910	SAK_1300		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8911	SAK_1302		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8912	SAK_1313		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8913	SAK_1320	scpB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
8914	SAK_1350		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8915	SAK_1358		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8916	SAK_1364		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8917	SAK_1381		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8918	SAK_1394		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8919	SAK_1404		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8920	SAK_1407		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8921	SAK_1426	fhuD	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8922	SAK_1438		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8923	SAK_1439		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8924	SAK_1440		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8925	SAK_1454		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8926	SAK_1466		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8927	SAK_1475		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8928	SAK_1493		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8929	SAK_1501		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8930	SAK_1503		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8931	SAK_1504		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8932	SAK_1513	secG	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8933	SAK_1521		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8934	SAK_1532		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8935	SAK_1542	nikA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8936	SAK_1556	mtsA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8937	SAK_1580		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8938	SAK_1625		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8939	SAK_1638		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8940	SAK_1655		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8941	SAK_1656		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8942	SAK_1660		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8943	SAK_1695		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8944	SAK_1784		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8945	SAK_1789		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8946	SAK_1796		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8947	SAK_1808		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8948	SAK_1809	dltD	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8949	SAK_1813	dltS	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8950	SAK_1842		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8951	SAK_1870		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8952	SAK_1880		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8953	SAK_1892		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8954	SAK_1897		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8955	SAK_1898		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8956	SAK_1901	cpdB	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8957	SAK_1905		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8958	SAK_1914		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8959	SAK_1921		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8960	SAK_1927		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8961	SAK_1961		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8962	SAK_1963		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8963	SAK_1964		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8964	SAK_1983	cfb	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8965	SAK_1988	metE	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8966	SAK_1991	cspA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8967	SAK_1994		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8968	SAK_2002		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8969	SAK_2005	pbp2A	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8970	SAK_2007		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8971	SAK_2017		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8972	SAK_2057		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8973	SAK_2062		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
8974	SAK_2099		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8975	SAK_2105		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8976	SAK_2106		<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8977	SAK_2125	arcC	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8978	SAK_2135	htrA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A909
8979	SPy_1006	lys	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8980	SPy_1007	speI	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8981	SPy_1008	speH	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8982	SPy_1054		<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8983	SPy_1436	mf3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8984	SPy_1983	scl	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8985	SPy_1998	smeZ	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8986	SPy_2016	sic	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
8987	STRMAG	mag	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
8988	STRPBP2BA	penA	<i>Streptococcus sanguis</i>	1907
8989	STRPBP2BC	penA	<i>Streptococcus oralis</i>	
8990	STRPRH		<i>Streptococcus pyogenes</i>	AP1
8991	SpyM3_0009		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8992	SpyM3_0014		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8993	SpyM3_0025		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8994	SpyM3_0074	pbp1B	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8995	SpyM3_0080	comYC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8996	SpyM3_0081		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8997	SpyM3_0082		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8998	SpyM3_0083	comYD	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
8999	SpyM3_0084		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9000	SpyM3_0098	cbp	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9001	SpyM3_0100		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9002	SpyM3_0104		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9003	SpyM3_0126		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9004	SpyM3_0128	nga	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9005	SpyM3_0130	slo	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9006	SpyM3_0131		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9007	SpyM3_0132		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9008	SpyM3_0154		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9009	SpyM3_0155	speG	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9010	SpyM3_0160	hasC.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9011	SpyM3_0180		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9012	SpyM3_0197	prgA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9013	SpyM3_0213		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9014	SpyM3_0214	dacA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9015	SpyM3_0215	oppA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9016	SpyM3_0232	atmA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9017	SpyM3_0233	atmB	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9018	SpyM3_0241	lemA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9019	SpyM3_0245	csrS	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9020	SpyM3_0276	hlyX	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9021	SpyM3_0282	fhuD.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9022	SpyM3_0305		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9023	SpyM3_0307		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9024	SpyM3_0316		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9025	SpyM3_0318	mtsA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9026	SpyM3_0321	cypB	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9027	SpyM3_0331		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9028	SpyM3_0332		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9029	SpyM3_0339		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9030	SpyM3_0343		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9031	SpyM3_0345		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9032	SpyM3_0351		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9033	SpyM3_0408		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
9034	SpyM3_0414		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9035	SpyM3_0415		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9036	SpyM3_0417		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9037	SpyM3_0418		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9038	SpyM3_0425		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9039	SpyM3_0427		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9040	SpyM3_0466	adcA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9041	SpyM3_0480	sagA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9042	SpyM3_0481	sagB	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9043	SpyM3_0482	sagC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9044	SpyM3_0489		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9045	SpyM3_0504	endA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9046	SpyM3_0515		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9047	SpyM3_0534		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9048	SpyM3_0551		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9049	SpyM3_0555		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9050	SpyM3_0563		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9051	SpyM3_0569		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9052	SpyM3_0581		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9053	SpyM3_0583		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9054	SpyM3_0589		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9055	SpyM3_0591		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9056	SpyM3_0594		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9057	SpyM3_0603		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9058	SpyM3_0619		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9059	SpyM3_0632		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9060	SpyM3_0633		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9061	SpyM3_0652		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9062	SpyM3_0653		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9063	SpyM3_0665	hlyA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9064	SpyM3_0670		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9065	SpyM3_0725	hlyP.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9066	SpyM3_0738	sclB	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9067	SpyM3_0747		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9068	SpyM3_0755		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9069	SpyM3_0756		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9070	SpyM3_0767	potD	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9071	SpyM3_0769		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9072	SpyM3_0773		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9073	SpyM3_0811		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9074	SpyM3_0813		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9075	SpyM3_0815	hlyIII	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9076	SpyM3_0833	citE	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9077	SpyM3_0844		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9078	SpyM3_0868		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9079	SpyM3_0881	pstS	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9080	SpyM3_0885	spxA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9081	SpyM3_0905	cfa	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9082	SpyM3_0906		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9083	SpyM3_0911	sipC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9084	SpyM3_0920	ssa	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9085	SpyM3_0923		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9086	SpyM3_0928		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9087	SpyM3_0929	hlyP.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9088	SpyM3_0983	malE	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9089	SpyM3_1032	grab	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9090	SpyM3_1035	inlA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9091	SpyM3_1044		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9092	SpyM3_1059	prsA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9093	SpyM3_1071	sodM	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315



## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
9094	SpyM3_1074	comEA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9095	SpyM3_1095	mf4	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9096	SpyM3_1102	pblB	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9097	SpyM3_1104	pblA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9098	SpyM3_1117		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9099	SpyM3_1147		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9100	SpyM3_1148		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9101	SpyM3_1150		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9102	SpyM3_1153	hlyA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9103	SpyM3_1182	dpr	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9104	SpyM3_1187		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9105	SpyM3_1191	arcC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9106	SpyM3_1204	sla	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9107	SpyM3_1205	speK	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9108	SpyM3_1214	hylP.4	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9109	SpyM3_1227		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9110	SpyM3_1265		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9111	SpyM3_1267	msrA.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9112	SpyM3_1268		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9113	SpyM3_1287		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9114	SpyM3_1289		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9115	SpyM3_1294	hyl	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9116	SpyM3_1301	speA3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9117	SpyM3_1313		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9118	SpyM3_1324		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9119	SpyM3_1376		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9120	SpyM3_1390	pbp1A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9121	SpyM3_1401	pbp2X	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9122	SpyM3_1409	sdn	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9123	SpyM3_1413		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9124	SpyM3_1418	hylP.6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9125	SpyM3_1431		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9126	SpyM3_1469		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9127	SpyM3_1493		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9128	SpyM3_1506		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9129	SpyM3_1534		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9130	SpyM3_1561		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9131	SpyM3_1562	isp.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9132	SpyM3_1568	ndoS	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9133	SpyM3_1598	cppA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9134	SpyM3_1616	gcp	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9135	SpyM3_1625	lppC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9136	SpyM3_1631		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9137	SpyM3_1670		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9138	SpyM3_1673		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9139	SpyM3_1694	pula	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9140	SpyM3_1698	ska	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9141	SpyM3_1702	sclA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9142	SpyM3_1703	sclA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9143	SpyM3_1718	dppA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9144	SpyM3_1726	scpA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9145	SpyM3_1731	isp.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9146	SpyM3_1732		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9147	SpyM3_1736		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9148	SpyM3_1737		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9149	SpyM3_1740	prsA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9150	SpyM3_1742	speB	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9151	SpyM3_1745	mf	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9152	SpyM3_1751		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9153	SpyM3_1756		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315

## 6 Anhang

Sondenbezeichnung	Genbezeichnung	Gen	Genursprungsspezies	Genursprungsstamm
9154	SpyM3_1758	pbp2A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9155	SpyM3_1762		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9156	SpyM3_1763		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9157	SpyM3_1784	pepO	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9158	SpyM3_1830		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9159	SpyM3_1837		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9160	SpyM3_1843		<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9161	SpyM3_1851	hasA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9162	SpyM3_1853	hasC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9163	SpyM3_1864	degP	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS315
9164	Spy_0436	speJ	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
9165	Spy_0711	speC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
9166	Spy_0737	epf	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SF370
9167	U25852		<i>Streptococcus equi</i>	Z5
9168	U31980	PrtF2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	100076
9169	U40026	sspB	<i>Streptococcus gordonii</i>	M5
9170	U50357_2448-3680	zif	<i>Streptococcus equi</i>	4881
9171	U50357_3915-4784	zooA	<i>Streptococcus equi</i>	4881
9172	X06173		<i>Streptococcus sp.</i>	G148
9173	X17241	sdc	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	H46A
9174	X67947	SfbI	<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 2071
9175	X78216	pbpX	<i>Streptococcus mitis</i>	10712
9176	X78217	pbpX	<i>Streptococcus oralis</i>	M3
9177	X83303	SfbII	<i>Streptococcus pyogenes</i>	A75
9178	Y12602	lppC	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	H46A
9179	Z12624	has	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	D181
9180	Z22186	pbp2b	<i>Streptococcus mitis</i>	K208
9181	Z22219	PAM	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AP53
9182	Z29088	fnb	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Se165
9183	Z29666	mig	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SC1
9184	Z95895	sodA	<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 33397
9185	Z95897	sodA	<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823
9186	Z95904	sodA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 35666
9187	Z95908	sodA	<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 27335
9188	Z95909	sodA	<i>Streptococcus mitis</i>	NCTC 12261
9189	Z95912	sodA	<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557
9190	Z95918	sodA	<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556
9191	Z99190	sodA	<i>Streptococcus gordonii</i>	NEM666
9192	Z99196	sodA	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	NEM895
9193	spyM18_0126	cbp	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS8232
9194	spyM18_1238	speL	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS8232
9195	spyM18_1239	speM	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS8232
9196	spyM18_2046	spa	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MGAS8232

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gursharan Singh Chhatwal für die Bereitstellung der Thematik und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität anfertigen zu können sowie für die Übernahme des Referats.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Dieter Jahn für die Übernahme des zweiten Referats dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Daniel Patric Nitsche-Schmitz für die ausgezeichnete Betreuung, zahllose konstruktive Diskussionen und seinen unerschütterlichen Optimismus. Die Anfertigung dieser Arbeit wäre ohne sein großes persönliches Engagement nicht möglich gewesen.

Beim Leiter des Instituts für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie des Universitätsklinikum Leipzig Prof. Dr. Arne C. Rodloff und seinen Mitarbeitern Dr. Claudia Friedrichs, Dr. Kristina Fickweiler, Annett Henning-Rolle und Gelimer Genzel möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Erstellung der Sammlung klinischer Streptokokkenisolate bedanken.

Dr. Robert Geffers und Claudia Wylegalla von der Microarrayplattform des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung danke ich für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Microarrayanalysen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Silvana Reißmann, die die Oligonukleotide für die *16S-rRNA*-spezifischen Polymerasekettenreaktionen zur Verfügung stellte.

Meinem geschätzten Kollegen Dr. Andreas Nerlich danke ich für zahlreiche praktische Hinweise und hilfreiche Diskussionen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Katja Mummenbrauer, Nina Janze, Sabine Lehne, Dr. Oliver Goldmann und alle anderen Mitglieder der Abteilung Mikrobielle Pathogenität für die Schaffung einer familiären Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei der Umschiffung zahlloser Untiefen des Laboralltags.

Meinen Eltern, die mir das Studium und somit auch die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten, danke ich ganz herzlich für all die vielen Hilfestellungen, die man leider gern als selbstverständlich betrachtet.

Sarah danke ich vor allem für ihre Geduld und die Unterstützung über all die Jahre hinweg.